



Ecole Doctorale BioSPC

**Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes
Spécialité Biologie Cellulaire, Cancérologie**

Présentée par

Lucas TREPS

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

**IMPLICATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES DES
CELLULES INITIATRICES TUMORALES DANS
L'AUGMENTATION DE LA PERMEABILITE VASCULAIRE
DU GLIOBLASTOME**

Sous la direction du Dr. Julie GAVARD

Soutenue le 2 Septembre 2015

Membres du jury :

Président : Dr. Pierre-Olivier COURAUD, Université Paris Descartes

**Rapporteurs : Dr. Pascale ZIMMERMANN, Université de Marseille
Dr. Gilles PAGES, Université de Nice**

**Examineurs : Dr. Hélène CASTEL, Université de Rouen
Dr. Jean-Sébastien SILVESTRE, Université Paris Diderot**

Directeur de thèse : Dr. Julie GAVARD, Université Paris Descartes

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. En particulier les rapporteurs Pascale Zimmermann et Gilles Pagès pour leur temps consacré à la lecture du manuscrit de thèse. Je remercie également les examinateurs Hélène Castel et Jean-Sébastien Silvestre. Enfin, je remercie Pierre-Olivier Couraud de sa présence en tant que président de jury, de la qualité de vie qu'il permet au sein de l'Institut Cochin, ainsi que de sa disponibilité pour des discussions scientifiques enrichissantes.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Julie Gavard, avec qui j'ai tant appris. L'exercice est plus compliqué qu'il n'y paraît, et résumer quatre années de relations professionnelles est finalement assez ardu ! Je me rappelle encore de l'entretien pour mon stage de Master 1, une discussion scientifique très intéressante qui laissait présager une bonne entente. Puis le stage de Master 2, entrecoupé de séjours à Cambridge et de cours à la fac, et la fatidique soutenance pour les bourses doctorales. Que de stress et de temps passé aux répétitions... Mais en tant que bon chef d'équipe Julie a su me rassurer et m'encourager quand je semblais baisser les bras. Enfin les trois années de thèse qui furent réellement une expérience inoubliable sur trame d'interactions agréables et de discussions enrichissantes humainement et professionnellement. Pour tout cela je l'en remercie à nouveau, merci de m'avoir intégré dans le laboratoire des *Gavardians* et je suis certain que l'on aura à nouveau l'occasion de travailler ou collaborer ensemble!

Un grand merci à Sandrine Bourdoulous, responsable de notre équipe, pour ses discussions et commentaires scientifiques durant nos réunions du jeudi matin. Ces présentations, véritables épreuves et source de stress au début lors du Master, sont par la suite devenues un simple exercice de partage de données entre collègues. Merci également à Haniaa pour sa gentillesse et ses bons gâteaux, Camille pour les discussions lors du déjeuner, Philippe, Kevin et Loïc pour leur présence amicale et surtout masculine !

Je remercie Nicolas Bidère, chercheur qui nous a rejoint tardivement à l'Institut en compagnie de Sonia, pour sa façon d'être particulièrement agréable et son esprit scientifique affûté. Nicolas a grandement contribué à l'analyse, la critique constructive et le rendu optimal de mon principal article scientifique. Merci également pour ses questions avisées durant les réunions d'équipe. En tant que représentant masculin du laboratoire Nicolas a été pour moi, aux côtés de Julie, un certain modèle scientifique.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe, présent ou passé, qui ont contribué à la bonne humeur et à l'émulation intellectuelle de l'équipe.

Je remercie Héloïse, assistante ingénieur du laboratoire, avec qui j'ai passé de très bons moments au sein de l'Institut, mais également à l'extérieur lors de sorties. Sa bonne humeur a véritablement contribué à la bonne ambiance de l'équipe.

Un grand merci à Sonia, qui bien qu'arrivée tardivement s'est parfaitement intégrée dans l'équipe de par son caractère méditerranéen communicatif et affectueux. Heureusement ce caractère n'était pas non plus trop exacerbé et nous n'étions pas non plus dans le cliché de la « cagole » *hé peu cher* ! ;-)

Thanks to Elizabeth, an australian postdoctorant who was always really kind and gentle. Thanks also for her surgical courses and all advises that Eliz could have communicated to me during these 1-year and a half.

Thanks also to Eva, a former Spanish postdoctorant who went back home in early 2015. I really enjoyed our scientific discussions and brainstorming, and our échanges avec la nuevo idioma, el FranSpaGlish! I hope one day we will see you again in Spain with Carlos.

Merci à maman Sandy qui a été une grande bouffée de fraîcheur et de bonne humeur, bien que parfois un peu trop protective (sans doute le côté Libanais). Cet aspect s'est d'ailleurs bien adouci depuis la naissance de sa jolie petite Elsa, la petite souris qui doit la combler de bonheur ainsi qu'Elie le papa.

Je remercie Jagoda, doctorante polonaise avant moi, avec qui j'ai passé de bons moments au laboratoire. Malgré sa franchise parfois un peu poussée, qu'elle a par la suite réussi à modérer, c'est une personne agréable et entière avec qui j'apprécie passer du temps : preuve en est de notre séjour au ski de 2015 !

I would like thank also to Sara, a Master 1 Spanish trainee, for her kindness and cheerful behaviour. I hope we will have the opportunity to get in touch near Tarragona this summer.

Thanks to Julie Dwyer, a former Aussie postdoctorant who was always smiling and really communicative. This smiles which was appreciably infectious. :-)

I would like to thank Sherri, a prior American postdoctorant for her time to teach me confocal rudiments at the beginning of my thesis.

Je remercie vivement Steven, postdoctorant Briérons, qui a malheureusement dû quitter le laboratoire pour raisons médicales. J'ai tout de suite sympathisé avec lui, et à bientôt j'espère pour une chasse aux ragondins dans les marais ou un verre de Banyuls au Bidule !

Merci à Armelle, ancienne doctorante qui m'a formé pendant mon stage de Master 1, et qui m'a appris, entre autres, les techniques d'étude de l'angiogenèse ainsi que tout les secrets pour cultiver les hCMEC/D3.

Je remercie tous les stagiaires de Master que j'ai eu l'occasion d'encadrer durant ma thèse. Merci à Antoine pour son sérieux et sa contribution sur mon article de thèse, fervent fan de Die Antwoord, je ne pouvais que l'apprécier ! Merci également à Camélia, une angevine avec qui j'ai apprécié travailler et initier un nouveau projet sur l'hypoxie tumorale.

Je remercie également les binômes Camilla et Adrien, ainsi qu'Isia et Tristan, élèves de troisième et première et participants à l'action Apprentis Chercheurs en 2013 et 2014. Ils sont venus un mercredi après-midi par mois dans l'année et m'ont permis d'améliorer ma capacité de médiation et de vulgarisation scientifique. Dans ce contexte, je remercie l'action Arbre des connaissances, et en particulier Aude, Morgane, Laurence, Karine et Jérémy pour leur sympathie, et l'ouverture sociétale que m'a permis cette expérience associative.

Merci à Cédric Auffray, qui m'a appris en première année les injections rétro-orbitales si délicates à réaliser. Je remercie également les plateformes de l'Institut, et en particulier Maryline Favier pour ses conseils vis-à-vis du cryostat, et Alain Schmitt pour ses acquisitions en microscopie électronique qui m'ont confirmé que je ne travaillais pas avec de l'eau mais bien des vésicules invisibles à l'œil nu !

Un grand merci à Evelyne Donsez, de la faculté des sciences de Descartes, dont la gentillesse et l'attention ont permis la bonne réalisation des nombreux TP de biologie. Je tiens d'ailleurs à remercier l'ensemble des enseignants chercheurs qui m'ont encadré durant ces trois années de monitorat : Magali Mas, Léa Rémy-Tourneur, Christel Becker, Sylvie Durant et David Dubayle. Ces divers TP et TDs ont été très enrichissants et ont confirmé mon grand intérêt dans l'enseignement.

Encore merci à Léa avec qui j'ai encadré de façon très agréable des TP, et avec qui j'ai pu partager de nombreuses discussions autour d'un café durant les interours. Je la remercie d'ailleurs de m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec elle et Sara sur un autre projet intéressant concernant les vésicules. A retenir donc, le café est bon pour les relations !

Merci à tous les amis de Cochin et de Saint Louis, avec qui j'ai passé de très bons moments durant les afterlabs JeCCo et AdeliH. Pour n'en citer que quelques uns : Loulou, Léa, Benoît, Damien, Ambroise, Marie-Lise, Romain, Sabrina et son rire communicatif, Adèle, Laura, Claire, Omar, Joris... Je remercie également les soirées jeux de plateau avec Stan et Guillaume !

Je remercie aussi mes sites préférés de streaming, qui grâce à Naruto Uzumaki, Ichiro Yamato et Monkey D. Luffy m'ont permis de faire des pauses salvatrices !

Un grand merci à ma famille, qui malgré la difficulté du sujet s'est toujours montrée intéressée par mes expériences et mon projet de thèse. Je remercie mon frère Marco pour nos conversations via Facebook, et les bons moments passés ensemble avec les parents durant les weekends champêtres à Epiré. Merci donc à mes parents, Arlette, Isabelle et Richard, Isabelle et Christophe, Michaël et Christelle pour leur présence, gentillesse et conseils vis-à-vis de notre emménagement futur à Bruxelles. Je remercie Daddy, mon grand père scientifique qui a toujours de si brillantes idées à 85 ans passé ! J'ai également une pensée particulièrement émue envers André, qui nous a quitté bien trop tôt, et qui se montrait toujours si intéressé par mes recherches « Et comment vont tes souris Lucas ? ».

Pour finir je souhaite remercier Céline qui en partageant mon quotidien a également subi mes sautes d'humeur durant la rédaction de thèse. Merci pour son écoute et de m'avoir assisté, imperturbable, aux répétitions d'oraux passablement incompréhensibles et probablement ennuyeuses ! ;-)

Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Liste des figures.....	9
Préambule	10
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I. LES SPECIFICITES DE L'ENDOTHELIUM CEREBRAL	12
I L'organisation du réseau sanguin.....	12
I.1 L'arbre vasculaire.....	12
I.2 La microcirculation	13
I.3 Les transports endothéliaux.....	14
I.3.i Les passages transcellulaires.....	14
I.3.ii Les passages paracellulaires.....	16
II L'irrigation cérébrale et la barrière hémato-encéphalique	17
II.1 Les vaisseaux cérébraux.....	17
II.1.i Irrigation générale du cerveau	17
II.1.ii L'unité neurovasculaire.....	18
II.2 Le cerveau, une unité à protéger	19
II.2.i Découverte des barrières du système nerveux central	19
II.2.ii La barrière hémato-encéphalique	20
a) Formation d'une BHE fonctionnelle.....	20
b) La sélectivité de l'endothélium cérébral	21
c) Le transport du glucose	21
d) Les transporteurs ioniques.....	22
e) Les transporteurs ABC	22
II.2.iii Effets d'une rupture de la BHE.....	23
III Les jonctions endothéliales cérébrales	24
III.1 Organisation générale.....	24
III.2 Les jonctions serrées	24
III.2.i Morphologie générale.....	24
III.2.ii Les protéines TAMPs et la perméabilité paracellulaire des petites molécules	25
a) Structure de l'occludine.....	25
b) Modifications post-traductionnelles de l'occludine	26
c) Les mutations de l'occludine	27
d) La tricelluline et MarvelD3.....	27
III.2.iii Les claudines.....	29
a) L'invalidation de la claudine-5.....	29
b) Modifications post-traductionnelles de la claudine-5.....	30
III.2.iv La famille des JAMs.....	30
a) Les fonctions biologiques des JAMs dans la barrière endothéliale.....	31
III.2.v Partenaires cytoplasmiques des jonctions serrées : la famille des MAGUKs.....	32
a) Les protéines ZO.....	32
b) Les protéines MAGI	33
III.3 Les jonctions adhérentes	33
III.3.i La VE-cadhérine, une cadhérine instrumentale de l'endothélium	34
a) Structure des cadhérines classiques	34
b) Les modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine	35
c) Les partenaires cytoplasmiques de la VE-cadhérine	37
L'α-caténine	37
La β-caténine	37
La γ-caténine.....	39
La caténine p120	39
III.3.ii PECAM-1.....	40

a)	Structure générale et interactions cellulaires	40
b)	Partenaires et modifications de PECAM-1	41
c)	Rôles biologiques de PECAM-1	42
III.4	Les autres jonctions de l'unité neurovasculaire	43
III.4.i	La N-cadhérine.....	43
III.4.ii	Les jonctions gap	43
CHAPITRE II. LA PERMEABILITE VASCULAIRE TUMORALE		45
I	Formation du système vasculaire.....	45
I.1	Développement de novo du système vasculaire	45
I.1.i	Etapes de la vasculogenèse.....	45
I.1.ii	Facteurs clés de la vasculogenèse	47
a)	Le VEGF dans les étapes précoces de la vascularisation	47
b)	Le FGF-2 et la macroglobuline en amont du VEGF	47
c)	La Sémaphorine 3A et la neuropiline-1	48
I.2	Les étapes de l'angiogenèse développementale	49
I.2.i	La sélection des cellules endothéliales de front	49
I.2.ii	Migration et guidage cellulaire	50
I.2.iii	Bourgeonnement et anastomose.....	52
I.2.iv	Perfusion et maturation du vaisseau	52
II	Perméabilité tumorale.....	53
II.1	Angiogenèse tumorale.....	53
II.1.i	Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux.....	53
II.1.ii	La part des vaisseaux sanguins dans la croissance tumorale	55
II.1.iii	Phénomènes métastatiques	56
II.2	Facteurs de la perméabilité tumorale.....	58
II.2.i	La famille du VEGF.....	58
a)	Les VEGFs, figures de proue dans l'homéostasie vasculaire.....	58
b)	Récepteurs et corécepteurs du VEGF	59
c)	Signalisation pro-perméabilité induite par le VEGF.....	60
II.2.ii	La Sémaphorine 3A	62
a)	Les sémaphorines.....	62
b)	Plexines, neuropilines et Sémaphorine 3A.....	63
c)	La Séma3A dans le système vasculaire	65
II.2.iii	L'interleukine 8.....	66
CHAPITRE III. COMMUNICATION ENTRE CELLULES ENDOTHELIALES ET CELLULES SOUCHES INITIATRICES DU GLIOBLASTOME		68
I.	Les tumeurs cérébrales.....	68
I.1	L'hétérogénéité des gliomes.....	68
I.1.i	Classification et grade	68
I.1.ii	Sous-types moléculaires des glioblastomes.....	69
I.2	Aspects cliniques du glioblastome.....	70
I.2.i	Une première ligne de traitement peu efficace.....	70
I.2.ii	Une récurrence largement inévitable	71
I.2.iii	Les causes de la récurrence	71
II.	Implication des cellules souches gliomateuses dans le glioblastome	73
II.1	Les cellules souches gliomateuses	73
II.1.i	Les cellules souches neurales.....	73
II.1.ii	Identification et culture des cellules souches gliomateuses	74
II.1.iii	Des marqueurs soumis à controverse	75
II.1.iv	L'origine des CSG et la notion de lignage.....	76
a)	Le rôle précoce de <i>TP53</i>	77

b) PTEN et la gliomagenèse.....	77
c) Rb1 comme autre pression de sélection.....	78
II.2 Les cellules souches gliomateuses	79
II.2.i Initiation tumorale et autorenouveaulement.....	79
a) EZH2 et STAT3.....	79
b) Nrp-1 pivot autour du VEGFR-2 et Séma3C.....	80
c) Gremlin1 et la voie BMP	81
II.2.ii Vascularisation alternative par les cellules tumorales.....	81
a) Mimétisme vasculaire.....	81
b) Trans-différenciation des CSG en cellules endothéliales	81
c) La trans-différenciation des CSG en péricytes	83
II.2.iii Résistance aux traitements	84
a) Une vascularisation tumorale résistante	84
b) Les voies de réparation de l'ADN	85
c) L'export de drogues	86
II.2.iv Nouvelles thérapies par ciblage des CSG.....	86
II.3 La niche vasculaire, un environnement protecteur des CSG	88
II.3.i Découverte et rôle.....	88
II.3.ii Rôle de l'endothélium dans la survie des CSG.....	88
II.3.iii CSG et modulation de la biologie endothéliale	89
III. Les vésicules extracellulaires : un mode de communication puissant	91
III.1 Communication extracellulaire par vésicules	91
III.1.i Exosomes :	91
III.1.ii Microvésicules :.....	92
III.1.iii Corps apoptotiques :.....	93
III.2 Vésicules extracellulaires et rôles dans les gliomes	94
III.3 Vésicules extracellulaires comme marqueur pronostic.....	95
CHAPITRE IV RESULTATS.....	97
Article de thèse	101
CHAPITRE V DISCUSSION	122
I La Séma3A, un nouveau sheriff en ville	123
I.1 La Séma3A : un réel facteur anti-angiogénique?.....	123
I.2 Comment la Séma3A induit la perméabilité vasculaire ?	125
I.3 La Séma3A un nouveau médiateur de l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral ?.....	127
II Les vésicules extracellulaires, des convoyeurs de fond	128
II.1 La genèse des vésicules extracellulaires et la gestion de leur contenu: mode par défaut ou sélectif ?	129
II.2 Les vésicules extracellulaires : un moyen de communication et de signalisation	130
II.3 Comment s'organise le transport des vésicules extracellulaires ?.....	132
III Quelles sont les retombées translationnelles ?	133
III.1 Les EVs sont-elles de nouveaux biomarqueurs de suivi théranostique du glioblastome ?	133
III.2 Vers de nouvelles stratégies pour contrecarrer les vésicules extracellulaires.....	136
III.3 Vers une normalisation de la perméabilité vasculaire ?	137
Annexes	139
Références bibliographiques	146

Liste des abréviations

A

α -SMA : Smooth Muscle Actin
ABC : ATP-Binding Cassette
Ang : Angiopoïétine
ARNm : ARN messenger

B-D

BHE : Barrière Hémato-encéphalique
CSG : Cellule Souche Gliomateuse
CSN : Cellule Souche Neurale
DLL4 : Delta-Like-4

E-F

EGFR : Endothelial Growth Factor
Receptor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
EV : Extracellular Vesicle
FAK : Focal Adhesion Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor

G-H

GBM : Glioblastome
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
hCMEC : human Cerebral Microvascular
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HUVEC : Human Umbilical Vein
Endothelial Cell

I-L

IL : Interleukine
JA : Jonction Adhérente
JAM : Junction Adhesion Molecule
JS : Jonction Serrée
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

M-N

miARN : micro ARN
MDR : MultiDrug Resistance
MMP : Matrix MetalloProteinase
MRP : MDR-Related Proteins
MV : Microvésicules
MVB : MultiVesicular Bodies
Nrp-1 : Neuropiline

P

PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell
Adhesion Molecule-1
PFKFB3 : PhosphoFructoKinase-
2/Fructose-2,6-Bisphosphatase
P-gp : P-glycoprotéine
PI3K : PhosphatidyInositol-3-OH-Kinase
Plxn : Plexine
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

R-S

ROS : Reactive Oxygen Species
Séma3A : Sémaphorine 3A
SVZ : Sub-Ventricular Zone

T

TAMP : Tight junction-Associated
MARVEL Proteins
tEC : tumor Endothelial Cell
TGF : Transforming Growth Factor
TMZ : Temozolomide

V-Z

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor
VVO : Organelles vésiculo-vacuolaires
ZO : Zonula Occludens

Liste des figures

- Figure 1.** Caractéristiques majeures des vaisseaux sanguins.
Figure 2. Organisation de divers capillaires.
Figure 3. Les transports endothéliaux.
Figure 4. L'irrigation du cerveau.
Figure 5. L'unité neurovasculaire.
Figure 6. Les barrières du système nerveux central.
Figure 7. Les transporteurs de la barrière hémato-encéphalique.
Figure 8. Les jonctions endothéliales.
Figure 9. La famille des TAMPs dans les jonctions serrées.
Figure 10. La place de la claudine-5 dans les jonctions serrées.
Figure 11. La VE-cadhérine, une protéine régulée par phosphorylation.
Figure 12. Grandes étapes de la vasculogenèse.
Figure 13. Implication du couple Séma3A VEGF durant la vascularisation cornéenne.
Figure 14. Les étapes de l'angiogenèse.
Figure 15. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux.
Figure 16. Interaction entre VEGF et ses récepteurs.
Figure 17. Les sémaphorines et leurs récepteurs.
Figure 18. Potentielles causes des récurrences du glioblastome.
Figure 19. Organisation de la niche des cellules souches neurales adultes.
Figure 20. Caractéristiques et marqueurs des cellules souches gliomateuses.
Figure 21. Modèle clonal de la gliomagenèse.
Figure 22. Les différents modes de formation des vaisseaux tumoraux.
Figure 23. Structure du vecteur FA-Alexa-pRNA-3WJ siLuc.
Figure 24. Les différents types de vésicules extracellulaires.
Figure 25. Structure détaillée d'exosomes de cellules gliomateuses.
Figure 26. Modèle d'étude de la barrière hémato-encéphalique.
Figure 27. Les cellules souches gliomateuses et leur dépendance aux facteurs endothéliaux.
Figure 28. Mécanisme d'internalisation de la VE-cadhérine sous l'effet de la Séma3A sécrétée par les cellules souches gliomateuses.
Figure 29. Microscopie confocale de vésicules extracellulaires purifiées de cellules souches gliomateuses.
Figure 30. Etude de la perméabilité vasculaire par Miles assay.
Figure 31. Etude de la perméabilité vasculaire cérébrale par microcirculation *in situ*.
Figure 32. Augmentation de l'expression de la Séma3A dans les patients glioblastome.
Figure 33. Perte d'expression de la Séma3A durant la progression tumorale.
Figure 34. Induction de l'expression de la Sémaphorine 3A par mimétisme hypoxique.
Figure 35. Dissémination des vésicules extracellulaires tumorales.
Figure 36. Technologie d'analyse des exosomes par iMER: *immuno-Magnetic Exosome RNA*.

Tableau 1. Classification par sous-type des gliomes de haut grade.

Tableau 2. Caractéristiques des patients étudiés et diagnostiqués glioblastome primaire.

Préambule

La place du cœur et du sang au fil des siècles

***L'esprit anime le cœur, siège de l'âme.** Voici la vision poétique qu'avaient les égyptiens et les grecs du cœur et de son rôle dans l'organisme. En effet, avant Aristote le lien entre cœur et sang n'avait pas été mis en lumière. Ce n'est qu'à partir du 3ème siècle avant J.C. qu'Aristote décrit, dans son *Traité des parties des animaux* (1), que "le sang part du cœur pour se précipiter dans les veines, tandis que le sang ne vient d'aucune autre partie dans le cœur. C'est lui qui est le principe et la source du sang". Le cœur n'apparaît plus alors comme le siège de l'âme mais le lieu d'où se crée le sang, et d'où "les veines courent dans le corps tout entier, puisqu'il faut que le sang aussi aille partout et pénètre [...] chacune des parties du corps" (1)*

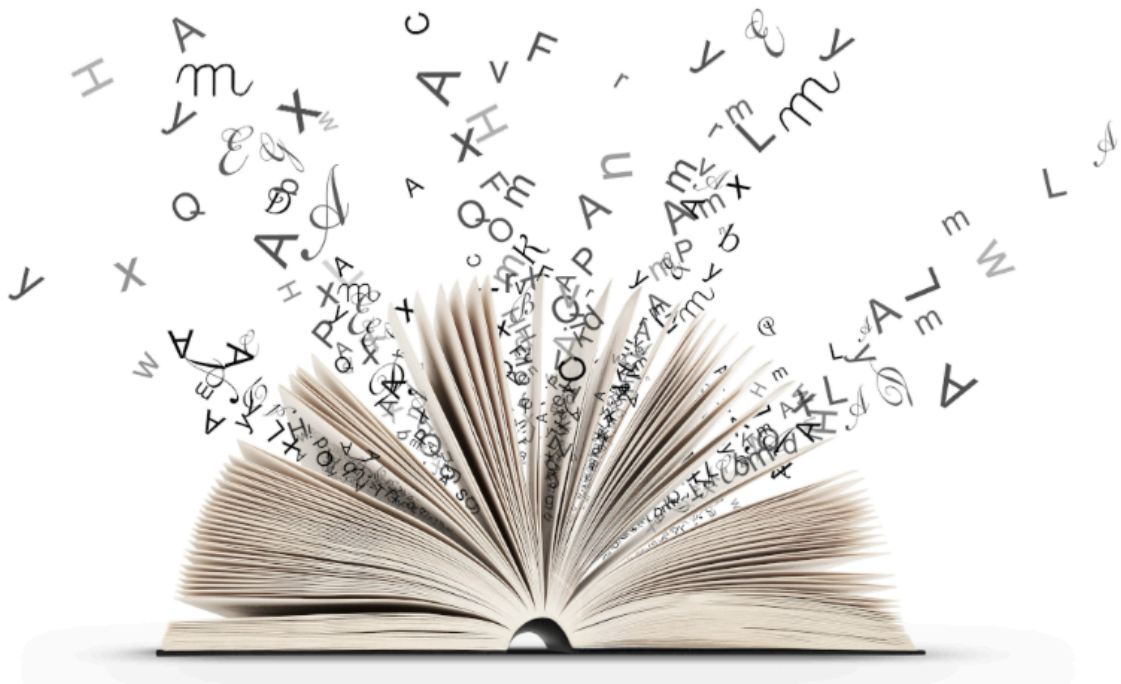
*Cette absence de précision vient en partie du fait qu'Aristote n'exerçait pas la dissection humaine, pratique qui n'apparut que vers le 2ème siècle après J.C. avec Galien. Celui-ci proposa une théorie (*De usu partium*) qui perdurera pendant plus de mille ans, et selon laquelle il existerait deux états sanguins. L'un appelé sang artériel conduisant la chaleur, et l'autre veineux issu du foie, chargé de nutriments provenant de l'alimentation. Un pas de plus avait été franchi sur le rôle précis du sang dans le corps. A partir de la moitié du 13ème siècle différents scientifiques tels que Ibn-Al-Nafis ou encore L. de Vinci critiquèrent petit à petit la théorie galéniste. Pour autant, il fallut attendre la Renaissance avec les travaux de W. Harvey en 1628 pour qu'une autre théorie soit exposée (2). Ce traité se basait sur une organisation relativement fidèle à la réalité excepté deux points qui furent éclairés à la fin du 17ème. Dans ce sens, R. Lower démontra d'abord le lien entre sang veineux et oxygénation en secouant le sang veineux dans un flacon ouvert afin que celui-ci reprenne sa couleur vermillon au contact de l'air. M. Malpighi, grand découvreur du microscope optique en 1661, fut le premier à observer des capillaires et donna une explication à l'irrigation intégrale des tissus du corps humain. Ainsi ce n'est qu'à la fin de la renaissance que la circulation sanguine fut réellement comprise. Il fallut cependant attendre les années 1970, après l'avènement de la biologie moléculaire, pour que le processus d'angiogenèse soit étudié in situ au cours du développement embryonnaire, et que J. Folkman mette en lumière son implication dans les tumeurs (3). M. Gimbrone et E. Jaffe en 1973 furent les premiers à cultiver in vitro des cellules endothéliales issues de cordon ombilical humain. A partir de l'élaboration de cet outil, les phénomènes moléculaires impliqués dans la formation des vaisseaux purent être décortiqués et identifiés.*

1. Aristote. *Traité des parties des animaux-De Partibus Animalium*.

2. Harvey, W. (1628) *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*.

3. Figg, W. and Folkman, J. (2008) *Angiogenesis: an integrative approach from science to medicine*. Springer.

Introduction



Chapitre I. Les spécificités de l'endothélium cérébral

I L'organisation du réseau sanguin

I.1 L'arbre vasculaire

Le système vasculaire est un réseau complexe qui s'étend sur une longueur cumulée d'environ 90.000 km, soit un peu plus de deux fois la circonférence de la Terre. Ce réseau fermé assure la répartition du débit sanguin entre les différents organes afin d'apporter nutriments et oxygène, et permet de réguler la température et de drainer les déchets métaboliques. Il peut être simplifié en distinguant deux systèmes circulatoires (systémique et pulmonaire) centrés sur le cœur.

L'arbre vasculaire est divisé en quatre types de vaisseaux selon leur taille et fonction (Figure 1) (Sherwood, 2012). Les artères, vaisseaux épais et élastiques, guident principalement le sang du cœur vers les organes tout en supportant les pressions élevées conséquentes à la contraction cardiaque. Cette résistance mécanique est assurée par un manchon de muscles lisses et de tissu protectif (élastine et collagène). Après de nombreuses ramifications, les artères principales et secondaires donnent naissance aux artérioles, qui possède également un revêtement de tissu musculaire lisse entouré d'une mince couche de tissu connectif. Les veines quant à elles, d'un diamètre moyen de 1 cm, assurent le lien entre organes et cœur en

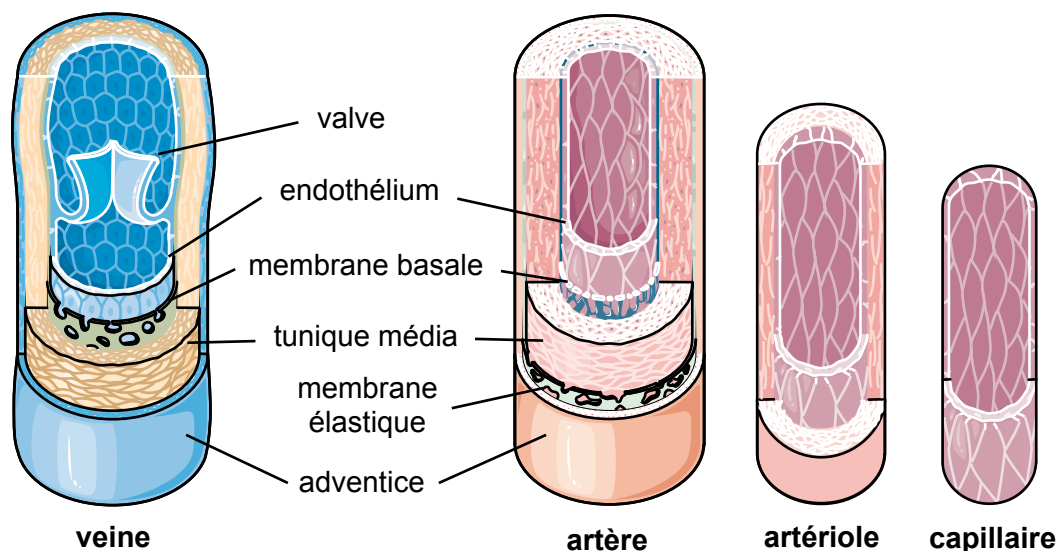


Figure 1. Caractéristiques majeures des vaisseaux sanguins. Dans les veines et artères, l'intima est composée de l'endothélium et de la membrane basale; la média majoritairement constituée de cellules musculaires lisses est entourée d'une membrane élastique. L'adventice est un revêtement externe contenant des fibres élastiques et fibroblastes. Les valves empêchent le retour sanguin veineux. (Servier).

faisant office de réservoir à faible pression sanguine (Figure 1). Enfin, les capillaires² maximisent les échanges, l'irrigation fine des tissus, et la jonction entre veinules et artérioles. L'ensemble, artérioles, capillaires et veinules post-capillaires, est désigné sous le nom de système microcirculatoire ou microvasculature. En termes d'échanges, il est souvent considéré que les artérioles ne sont pas impliquées, les capillaires constituent en effet le site majeur de passage de fluide. Les veinules sont quant à elles le lieu de diapédèse des leucocytes et de fuite des protéines plasmatiques (i.e. albumine, globuline) (Yuan and Rigor, 2010). En outre, les vaisseaux lymphatiques sont une composante importante de l'arbre vasculaire. Généralement situés aux alentours des vaisseaux, ils sont responsables de la réabsorption des fluides et du plasma présents dans le tissu interstitiel. Ce drainage lymphatique est observé dans la plupart des tissus, excepté les os et les cartilages (Yuan and Rigor, 2010). Récemment, par microscopie confocale sur cerveau entier de souris, un réseau lymphatique du système nerveux central a été identifié en étroite association avec le réseau vasculaire. La découverte de ce système lymphatique met ainsi à bas un dogme, et permet alors de drainer protéines plasmatiques, fluides et cellules immunitaires présents dans le liquide céphalo-rachidien³ (Louveau et al., 2015).

I.2 La microcirculation

Surface d'échange cruciale, les capillaires sont constitués de l'endothélium et d'une fine membrane basale, mélange de collagène de type IV, protéoglycanes et laminines (Figure 1) (Paulsson, 1992; Sherwood, 2012). La perméabilité relative de ces capillaires s'adapte afin d'assurer les demandes et fonctions de certains organes. Cette perméabilité peut d'ores et déjà être brièvement définie comme la propriété des vaisseaux à réguler le passage de composants du compartiment sanguin vers le tissu environnant et *vice versa*.

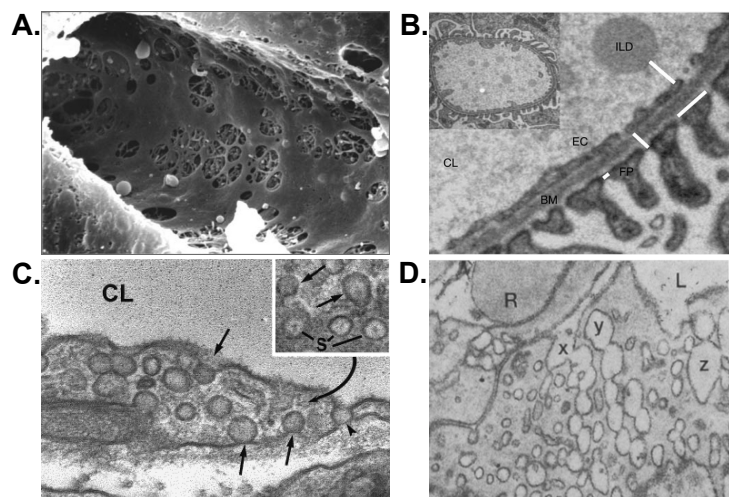


Figure 2. Organisation de divers capillaires. A. Capillaires sinusoides hépatiques (Vollmar and Menger, 2009). B. Capillaires fenestrés rénaux (Friden et al., 2011). C. Cavéoles (Bendayan, 2002). D. Organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) (Feng et al., 1996).

² estimés chez l'Homme à 1000 milliards

³ développé dans la partie II de ce chapitre

En fonction de leur localisation, il existe deux classes de capillaires : continus et discontinus. Au sein des microvaisseaux discontinus, distinction est faite entre les capillaires sinusoïdaux (Figure 2A) et fenestrés (Figure 2B), que l'on retrouve notamment dans le foie et le rein, respectivement. La grande majorité des organes, tels que cerveau, poumons ou muscles squelettiques possède un endothélium dit continu. Dans ce cas, les cellules endothéliales sont fermement reliées les unes aux autres par des jonctions cellule-cellule, que nous décrirons dans la partie III de ce chapitre. Ces cellules sont entourées d'une membrane basale continue, parfois recouverte de péricytes assurant la contractilité. Cette organisation restreint le passage passif aux molécules de moins de 3 nm de diamètre moléculaire : eau, gaz dissous et certains solutés (Yuan and Rigor, 2010). Afin de passer au travers de cet endothélium, les molécules plus grandes doivent emprunter des voies spécifiques, nécessitant ou non, la consommation d'énergie.

I.3 Les transports endothéliaux

I.3.i Les passages transcellulaires

Le passage transcellulaire détermine la capacité de traverser la barrière endothéliale à travers les cellules, par opposition au passage paracellulaire qui s'effectue entre celles-ci. Une analyse structurale détaillée menée par microscopie électronique, permet à G. Palade (Bendayan, 2002) de mettre à jour de nombreuses structures vacuolaires de 50 à 100 nm de diamètre accumulées sous la membrane plasmique des cellules endothéliales (Figure 2C) (Bendayan, 2002). Ces vésicules nommées cavéoles sont riches en cholestérol, dépourvues de clathrine et présentes en grande quantité dans la cellule endothéliale puisqu'elles représentent environ 20% du volume cellulaire avec 10.000 à 30.000 cavéoles par cellule (Bendayan, 2002). Il incombe alors à ces vésicules d'assurer le passage transendothélial de la face luminale vers le pôle basal (Figure 3). De façon intéressante, ces cavéoles n'ont pas toutes le même devenir. Dans des cellules HeLa exprimant une protéine de fusion cavéoline-GFP, il a en effet été observé deux comportements différents (Pelkmans and Zerial, 2005). Presque la moitié du lot des cavéoles reste relativement statique et assemblée sous forme de complexes multi-cavéolaires en un véritable manteau sous-membranaire (Figure 2C). Cette population de cavéoles n'a pas encore de rôle bien défini, mais pourrait servir de réservoir aux autres cavéoles. La deuxième moitié des cavéoles effectue des interactions labiles de type *kiss-and-run* entre la membrane plasmique et le milieu extracellulaire. Ces cavéoles dynamiques semblent quant à elles être responsables du transport de molécules vers les différents compartiments cellulaires, ou au travers de l'endothélium (Pelkmans and Zerial, 2005).

Il est important de retenir que la transcytose est un mécanisme majeur pour le passage de macromolécules plasmatiques, comme l'albumine qui régule la pression osmotique⁴ (Yuan and Rigor, 2010). Des analyses par microscopie confocale sur des cellules endothéliales de capillaires pulmonaires bovins révèlent que la formation des cavéoles fait intervenir un mécanisme de pinocytose dépendante de l'albumine et médiée par le récepteur Gp60 (Minshall et al., 2000). Ce dernier est ensuite internalisé suite au recrutement des cavéolines par une voie de signalisation non canonique faisant intervenir la protéine G α i et la kinase Src (Minshall et al., 2000). De façon similaire, le captage des macromolécules peut également s'effectuer par endocytose dépendante de la clathrine, par l'intermédiaire de nombreux récepteurs membranaires (transferrine, récepteurs tyrosine kinase etc.).

Vers la fin des années 90, les travaux dirigés par Ann et Harold Dvorak dévoilent d'autres structures vésiculaires existants dans les cellules endothéliales des capillaires (Dvorak et al., 1996). Ces organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) occupent une place conséquente de la cellule: 16 à 18% ; et forment des structures en grappe grâce à l'interconnexion de vésicules cytoplasmiques de 80 à 140 nm de diamètre et exemptes de cavéoline (Feng et al., 1996; Predescu et al., 2004). La fusion de ces VVO peut être collective et mener à la création de canaux transendothéliaux reliant les faces luminale et basale (Figures 2D et 3) (Bendayan and Rasio, 1997). Ces canaux permettent alors le transport transcellulaire passif de certaines macromolécules plasmatiques, telles que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), la

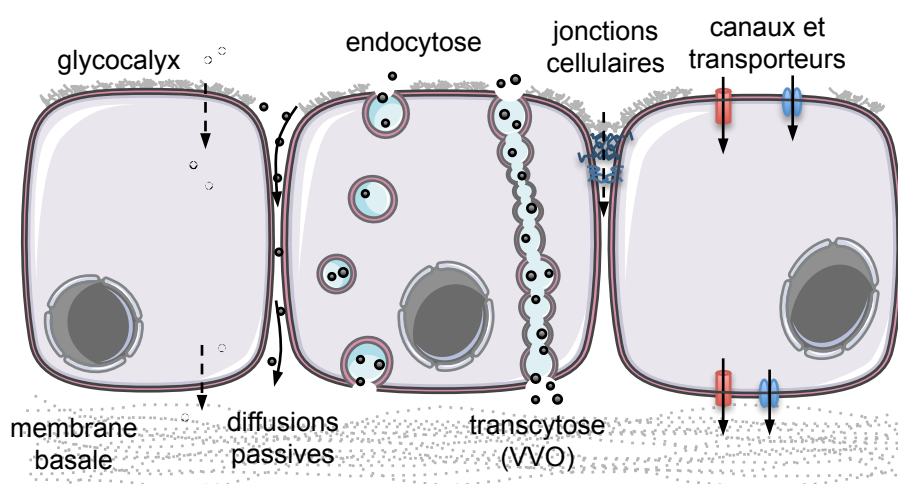


Figure 3. Les transports endothéliaux. Transports transcellulaires par endocytose (cavéoles et vésicules de clathrine), diffusion passive, transcytose via les organelles vésiculo-vacuolaires (VVO), canaux et transporteurs. Transport paracellulaire par diffusion passive ou active via relâchement des jonctions endothéliales.

⁴ c'est-à-dire l'équilibre en eau entre le tissu environnant et le compartiment sanguin

sérotonine ou encore l'histamine, mais aussi de cellules immunitaires, notamment les leucocytes (Lossinsky and Shivers, 2004). Il faut noter que ce type de transport n'est *a priori* pas présent dans les barrières hautement sélectives comme la barrière hémato-rétinienne ou la barrière hémato-encéphalique, qui sera décrite plus loin.

Ainsi, au moins trois grands types de passage au travers de l'endothélium coexistent: la diffusion passive, facilitée ou active, la transcytose via les VVO, et l'endocytose par les cavéoles ou les vésicules de clathrine (Figure 3). On notera qu'outre ces mécanismes, le glycocalyx, présent sur la face luminale des vaisseaux et recouvrant les jonctions endothéliales, ajoute un niveau supérieur de complexité (Lossinsky and Shivers, 2004). Le glycocalyx, composé d'un mélange de glycoprotéines, acide sialique et de protéoglycanes chargés négativement, adsorbe de nombreuses molécules circulantes présentes dans le sang (i.e. albumine, hyaluronane) et fait office de filtre de taille et de charge des molécules plasmatiques (Satchell, 2013).

1.3.ii Les passages paracellulaires

Comme mentionné plus haut, les cellules endothéliales sont liées entre elles par des jonctions cellule-cellule (Figure 3). Ces zones de rapprochement membranaire sont instrumentales pour l'intégrité vasculaire et la régulation des échanges entre compartiment sanguin et tissu environnant. Lors du passage paracellulaire, fluides, macromolécules ou cellules se confrontent principalement à deux types de jonctions : des jonctions adhérentes (JA) et des jonctions serrées (JS) (Mehta and Malik, 2006). Les JA sont présentes dans la plupart des endothéliums microvasculaires, alors que les JS sont moins bien représentées, et plus spécialisées de certaines barrières telle que la barrière hémato-encéphalique (Hawkins and Davis, 2005). Les JS sont restrictives et imperméables aux molécules inférieures à 1 kDa, voire aux petits ions inorganiques (i.e. Na^+). De leur côté, les JA, perméables aux petites molécules, modulent elles aussi le passage de macromolécules, comme par exemple celui de l'albumine (Mehta and Malik, 2006). Que ce soit au niveau des JS ou des JA, le passage de molécules se fait de façon active et via la déstabilisation de protéines transmembranaires, un point qui sera développé ultérieurement.

Ces différents modes de perméabilité et d'échanges à travers l'endothélium microvasculaire, et en particulier les transports paracellulaires, sont régulés différemment selon les organes et les conditions physiopathologiques. Un des exemples les plus frappants concerne le microendothélium cérébral dont la sélectivité de franchissement des molécules est la plus haute.

II L'irrigation cérébrale et la barrière hémato-encéphalique

La protection du tissu nerveux est assurée notamment par les méninges organisées en trois couches : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Il est à noter que l'arachnoïde constitue pour les vaisseaux cérébraux superficiels, une barrière entre le compartiment sanguin et le liquide céphalo-rachidien (LCR). Importante surface d'échange, entre ces deux couches, le LCR est principalement composé d'ions en solution aqueuse (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^-). Notamment, l'espace sous-arachnoïdien, parfois appelé leptoméninges, communique directement avec les ventricules et est donc baigné de ce liquide (Barshes et al., 2005). Le LCR circule entre les différents ventricules et atteint l'ensemble du cerveau en environ six heures chez l'Homme, pour deux heures chez le rat (Johanson et al., 2008). Il contribue en particulier aux échanges métaboliques et nutritifs avec le tissu nerveux.

II.1 Les vaisseaux cérébraux

II.1.i Irrigation générale du cerveau

Le cerveau, qui ne représente pas plus de 2% de la masse corporelle totale reçoit 20% du flux cardiaque et est responsable du quart de la consommation totale en oxygène (Zlokovic, 2011). L'irrigation du cerveau passe par deux paires de larges artères, les carotides internes et les artères vertébrales (Figures 4A). Les premières irriguent le cervelet, et les secondes le cerveau ainsi que le tronc cérébral. Ces deux paires d'artères se rejoignent et s'anastomosent

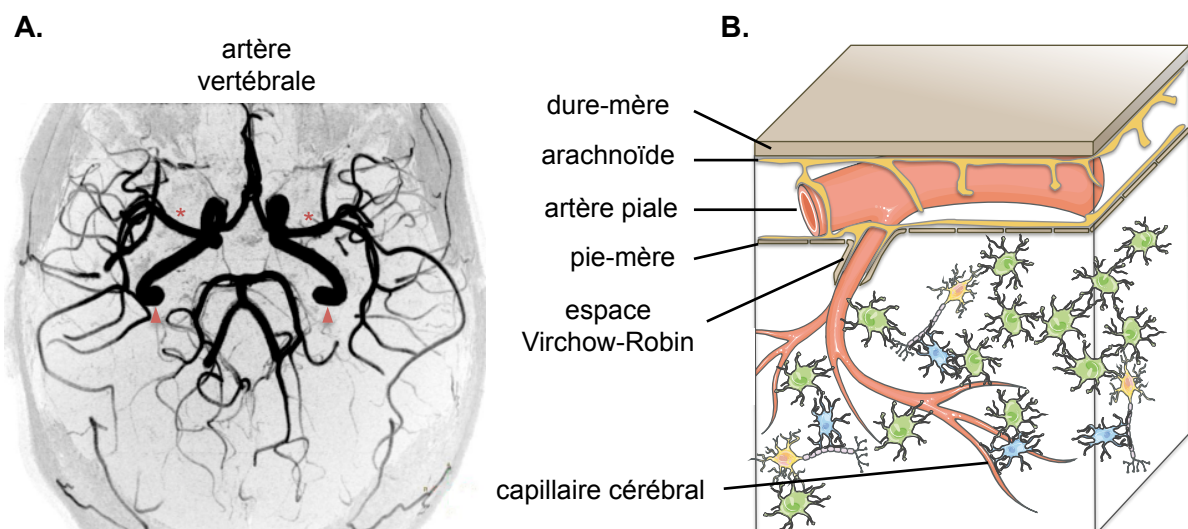


Figure 4. L'irrigation du cerveau. A. Imagerie par résonance magnétique représentant le polygone de Willis. Artères carotides avec une flèche, et artères cérébrales avec une astérisque. B. Représentation des artères piales dans l'espace sous-arachnoïdien et leur différenciation en artéioles pénétrantes puis capillaires cérébraux.

à la base inférieure du cerveau dans une zone appelée polygone de Willis⁵ (Figure 4A). De cette anastomose dérivent trois paires d'artères majeures, les artères cérébrales antérieures, médianes et postérieures, qui irriguent l'ensemble du cerveau. Ces artères subissent de nombreuses ramifications et diminuent progressivement de diamètre. Au sein de l'espace sous-arachnoïdien, situé entre la dure-mère et la pie-mère, les artères efférentes nommées artères piales y sont baignées dans le LCR (Figure 4B) (Jones, 1970). Structuralement, les artères piales possèdent de nombreuses ramifications et anastomoses. Elles sont entourées de cellules neurales qui peuvent, par innervation extrinsèque, moduler la contraction myogénique et donc le débit sanguin (Zlokovic, 2011). Afin d'irriguer l'intérieur du cerveau, les artères piales pénètrent le parenchyme cérébral et se subdivisent en artérioles intracérébrales. Cette invasion se déroule dans les espaces de Virchow-Robin, qui sont des canaux en continuité avec l'espace sous-arachnoïdien et entourant les vaisseaux pénétrants (Figure 4B) (Jones, 1970). A partir de cette zone, les artères piales se divisent en artérioles intracérébrales puis en capillaires cérébraux qui s'introduisent profondément dans le cortex cérébral. Structuralement, à l'intérieur du cortex, les microvaisseaux pénétrants ne sont pas directement entourés de nerfs mais ont une innervation qui est qualifiée d'intrinsèque (Zlokovic, 2011). Ces microvaisseaux reçoivent alors directement des neurones et astrocytes alentours les neurotransmetteurs modulant la vasoconstriction (Zlokovic, 2011). En raison de ce réseau vasculaire complexe, des injections systémiques de traceurs montrent que le sang irrigue l'intégralité du cerveau en dix secondes chez un Homme sain, et en trois secondes chez la souris (Muir et al., 2008; Oldendorf and Kitano, 1967).

II.1.ii L'unité neurovasculaire

Les capillaires⁶ cérébraux, à endothélium continu, possèdent une architecture unique formée de cellules endothéliales entourées d'une membrane basale de collagène et de laminine (30-40 nm d'épaisseur), et doublée par les pieds astrocytaires (Figure 5A) (Zlokovic, 2008). Ces cellules neurales peuvent moduler le diamètre des capillaires cérébraux par la sécrétion de molécules vasoactives (Mulligan and MacVicar, 2004), mais également influencer sur la perméabilité vasculaire par la production de facteurs pro-perméabilité, tels que le VEGF (Argaw et al., 2012; Chapouly et al., 2015) et l'interleukine-1 β (Argaw et al., 2006). Il est à noter que ces molécules sont dérégulées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Zlokovic, 2008). Les péricytes sont également fortement présents dans l'unité

⁵ du nom de Sir Thomas Willis son découvreur à la mi-17^{ème}

⁶ mis bout à bout représentent une distance de 650 km soit environ le trajet aller-retour Paris-Leuven

neurovasculaire. En effet, le ratio péricyte sur cellule endothéliale est de 1:3 dans le cerveau, pour 1:100 dans les muscles striés, soulignant de fait leur importance dans cet organe (Allt and Lawrenson, 2001). Les péricytes partagent leur membrane basale avec les cellules endothéliales adjacentes et forment de nombreuses protrusions cytoplasmiques enveloppant les capillaires. De plus, dans certaines zones où la membrane basale apparaît trouée, les péricytes sont directement en contact avec la membrane plasmique des cellules endothéliales (Figure 5B). Ces points de contact en « pince à linge » (*peg-and-socket contact*) sont riches en dépôt de fibronectine, JA, JS et jonctions gap qui ont un rôle crucial pour la stabilité des vaisseaux et la transmission des forces mécaniques de contraction depuis les péricytes vers l'endothélium (Zlokovic, 2008).

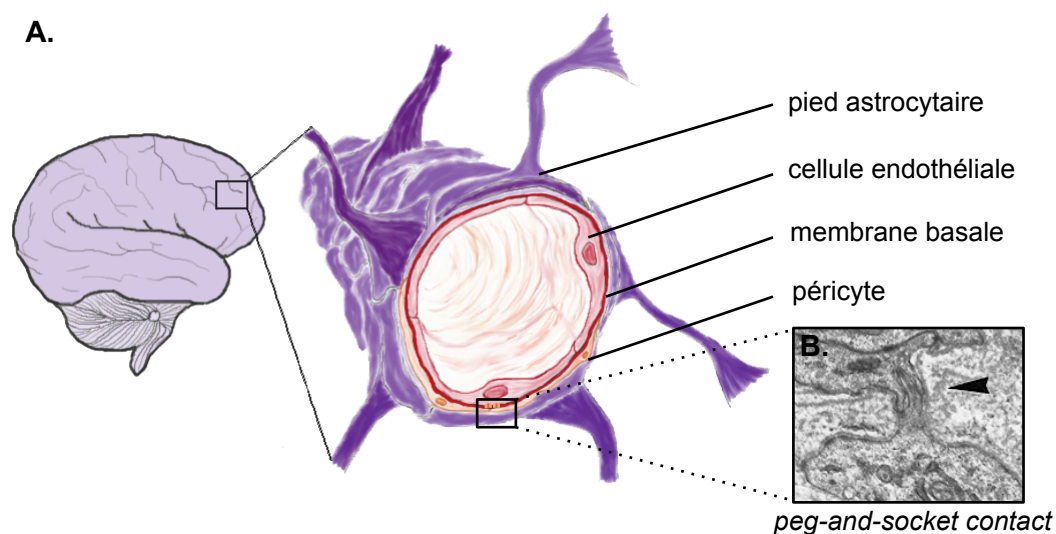


Figure 5. L'unité neurovasculaire. A. Organisation générale de la barrière hémato-encéphalique. B. Zone de contact en « pince à linge » entre péricyte et cellule endothéliale observée par microscopie électronique. (Encart de droite d'après Caruso et al., 2009).

Ainsi, la composante vasculaire, avec l'endothélium et les péricytes, interagit étroitement avec la composante neuronale (Zlokovic, 2008). Cet ensemble contribue alors au maintien de l'homéostasie de l'endothélium cérébral et à la fonction de barrière des capillaires cérébraux.

II.2 Le cerveau, une unité à protéger

II.2.i Découverte des barrières du système nerveux central

En dépit des différences architecturales entre les vaisseaux cérébraux (artères piales, artérioles intracérébrales et capillaires cérébraux), tous possèdent un endothélium spécialisé avec des propriétés de barrière spécifique. Les premières études ont été menées par P. Ehrlich en 1885 qui observa que le Bleu Evans, un colorant bleu à haute affinité pour l'albumine plasmatique, injecté de façon systémique dans le rat parvient à teindre tous les organes excepté le cerveau.

En outre, l'injection de Bleu Evans directement dans l'espace sous-arachnoïdien a mis en évidence une restriction du colorant principalement au niveau de la corde, des nerfs optiques et des zones olfactives, le système nerveux central étant exempt de toute coloration (Figure 6) (Goldmann, 1909). Conjointement, ces deux expériences suggèrent l'existence d'au moins trois barrières : la barrière hémato-encéphalique, c'est-à-dire la restriction entre le sang périphérique et le cerveau, une deuxième barrière opérant entre le LCR et le sang, et une troisième entre ce même liquide et le système nerveux central (cérébrum et cérébellum).



Figure 6. Les barrières du système nerveux central. Injection de Bleu Evans dans l'espace sous-arachnoïdien d'embryon de poulet (Goldmann, 1909).

II.2.ii La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est la barrière majoritaire du cerveau. Elle assume une fonction cruciale dans la protection contre les pathogènes et les xénobiotiques, dans le contrôle immunologique cérébral, et dans la prévention du passage de protéines ou fluide du sang vers le tissu cérébral. Après la présentation de la formation de la BHE au cours du développement embryonnaire, les différentes caractéristiques de cette barrière sont exposées.

a) Formation d'une BHE fonctionnelle

Malgré son implication fondamentale dans le fonctionnement normal et pathologique du système nerveux central, les modalités de la mise en place de la BHE ne sont pas entièrement élucidées. Dans le cerveau murin, un premier arbre vasculaire périneural s'établit vers E8, puis bourgeonne et envahit le tube neural à E10. Bien qu'immatures, ces vaisseaux sont aptes à conduire le sang. Par la suite, de nombreux facteurs solubles, tels que VEGF, Wnt ou les angiopoïétines induisent la différenciation des cellules endothéliales cérébrales, en permettant notamment l'expression de transporteurs spécifiques et la formation de jonctions cellule-cellule matures (Bauer et al., 2014). L'unité neurovasculaire ne devient fonctionnelle qu'après recrutement des péricytes à E12-13, sous l'effet du PDGF- β (*Platelet Derived Growth Factor*). A ce stade, des embryons de souris perfusés avec du bleu Trypan sont exempts de coloration au niveau du système nerveux central, suggérant alors une BHE d'ores et déjà opérationnelle (Bauer et al., 2014). De nombreuses modifications, dont la nature n'est pas totalement connue, ont lieu jusqu'à au moins quatre jours post-natal (Bauer et al., 2014) (voir

évolution de la résistance électrique transendothéliale chez l'embryon de rat ci-dessous (Butt et al., 1990)).

b) La sélectivité de l'endothélium cérébral

Tout d'abord, les cellules endothéliales cérébrales possèdent des JA et JS qui régulent finement la perméabilité paracellulaire. Ces jonctions, que nous développerons amplement par la suite, peuvent être modulées par de nombreux facteurs externes et sont cruciales pour l'intégrité de la BHE. L'endothélium cérébral possède également un transport transcellulaire sélectif et limité en pinocytose (Xu et al., 2015). Ainsi, seules les petites molécules liposolubles de moins de 400 Da et portant au maximum neuf ponts hydrogène (i.e. oxygène, dioxyde de carbone, vitamines D) peuvent diffuser passivement à travers l'endothélium (Pardridge, 2005). Pour les molécules plus grosses ou lipophobes (cytokines, glucose, acides aminés et nutriments), un passage facilité est nécessaire, via des récepteurs transmembranaires (endocytose clathrine dépendante, cavéoles) ou des transporteurs membranaires spécifiques. Ces transporteurs sont particulièrement nombreux et polarisés dans les capillaires cérébraux. Cette stratégie d'enrichissement orienté de transporteurs ou enzymes catalytiques, est un mécanisme permettant de générer des gradients de concentration et l'export de métabolites potentiellement toxiques (acides aminés non essentiels, glutamate) (Zlokovic, 2008).

c) Le transport du glucose

Soixante pourcent du stock en glucose de l'organisme, soit 120 g par jour, sont utilisés par le cerveau (Berg JM, 2002). Le transporteur GLUT1 est impliqué dans le transport bidirectionnel de cet hexose, de façon indépendante de l'ion sodium (Qutub and Hunt, 2005). La répartition de ce transporteur n'est pas symétrique sur l'endothélium, puisqu'il est davantage présent sur la face abluminale (c'est-à-dire la face qui donne sur le cerveau) où il engendre un flux de glucose du sang vers le tissu cérébral (Figure 7). Le glucose diffuse ensuite à travers la membrane basale et est principalement utilisé par les neurones environnants (Simpson et al., 2007). Chez l'homme, des mutations du gène *GLUT1* engendrent une microcéphalie conduisant à des troubles mentaux et des retards de croissance. Par ailleurs, l'expression de ce transporteur membranaire est significativement réduite chez les individus atteints de la maladie d'Alzheimer (Zlokovic, 2008).

d) Les transporteurs ioniques

Comme mentionné précédemment, des ions et en particulier l'ion Na^+ , sont parfois indispensables au passage de molécules utilisant les transporteurs facilités. L'ion Na^+ ne peut emprunter la voie paracellulaire pour diffuser passivement au travers de l'endothélium, en effet, les JS lui sont imperméables (Sorensen, 1974). Ainsi, via la pompe Na^+ ATP-dépendante, trois ions Na^+ sont échangés contre deux ions K^+ , favorisant ainsi une haute concentration en ions Na^+ dans le milieu cérébral (Figure 7) (Yuan and Rigor, 2010). Les endothéliums apparaissent alors comme des isolateurs électriques dont la résistance par unité de surface (Ohm.cm^2) peut être mesurée et comparée dans différents modèles et conditions physiologiques et pathologiques. Une augmentation du nombre de pores dans la barrière endothéliale résulte en une diminution de

cette résistance électrique (Yuan and Rigor, 2010). Par exemple, cette résistance électrique mesurée au niveau de la BHE d'embryons de rat évolue au cours du développement. Elle est initialement de 310 Ohm.cm^2 à E17, suggérant alors une barrière immature, puis se renforce et devient moins perméable aux ions avec des valeurs de 1128 Ohm.cm^2 à E21, et enfin 1462 Ohm.cm^2 à l'âge adulte (Butt et al., 1990).

e) Les transporteurs ABC

Jusqu'à présent nous avons principalement développé les transports passifs et facilités au travers de l'endothélium cérébral. Cet endothélium est également caractérisé par sa propension à excréter drogues et principes actifs lipophiles qui auraient traversé passivement l'endothélium vasculaire. Les transporteurs ABC, pour *ATP-Binding Cassette*, représentent la plus grande famille de protéines transmembranaires avec 51 membres répartis

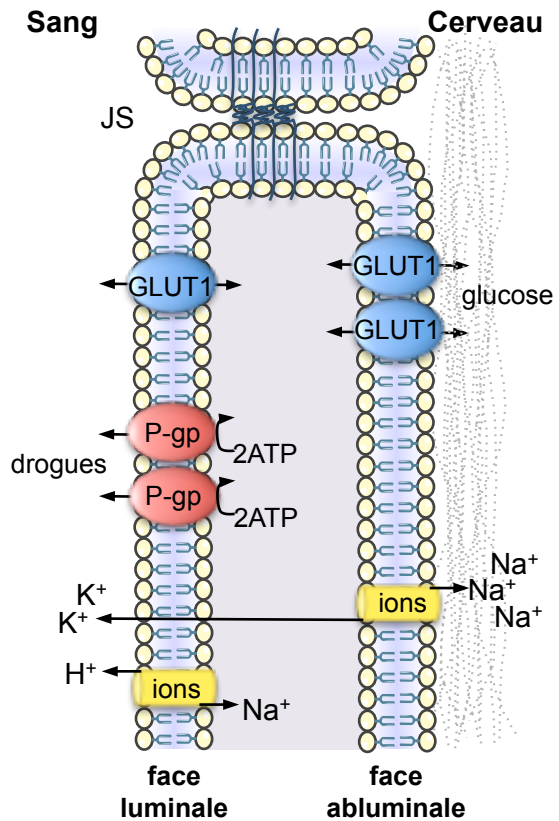


Figure 7. Les transporteurs de la barrière hémato-encéphalique. Représentation de deux cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées (JS). L'expression de transporteurs facilités au glucose (GLUT1), transporteurs actifs de drogues P-glycoprotéine (P-gp) et transporteurs ioniques (ions) assure la sélectivité de l'endothélium microcérébral.

en sept sous-familles (A-G) (Saier et al., 2006). Au sein de cette grande famille, les sous-familles B (MDR, *MultiDrug Resistance*) et C (MRP, *MDR-Related Proteins*) sont cruciales pour l'export actif de drogues. Ces transporteurs sont conjointement exprimés par les deux faces de l'endothélium, l'enveloppe nucléaire, et différents organites cellulaires, mais également par les péricytes et astrocytes voisins (Bendayan et al., 2006). La face luminale des microvaisseaux cérébraux possède une densité de récepteurs MRPs plus grande (Figure 7), permettant de fait le relargage dans la circulation sanguine des composés ayant traversé la membrane plasmique endothéliale. Le transporteur P-glycoprotéine (P-gp ou ABCB1), encodé par le gène *MDR1* est jusqu'à présent le mieux caractérisé (Zlokovic, 2011). Du point de vue structural, la P-gp est une protéine transmembranaire constituée de six domaines extracellulaires, et deux sites intracellulaires de fixation de l'ATP. La liaison d'ATP lui confère une haute affinité pour les drogues hydrophobes, généralement situées entre les deux feuillets de la membrane plasmique, et qui sont excrétées hors de la cellule après hydrolyse de l'ATP (Al-Shawi and Omote, 2005). De façon intéressante, des mutations du gène *MDR1* codant la P-gp pourraient prédisposer à la maladie de Parkinson suite aux effets nocifs de pesticides (i.e. Paraquat chez le rat) et autres xénobiotiques (Zlokovic, 2011).

Ainsi, de par ses spécificités structurales et moléculaires, la BHE confère une haute sélectivité de passage aux macromolécules, drogues et cellules au travers l'endothélium microvasculaire.

II.2.iii Effets d'une rupture de la BHE

Comme mis en lumière précédemment, la BHE est une structure essentielle pour le fonctionnement correct des neurones, la protection du cerveau contre les pathogènes et la surveillance immunitaire (Zlokovic, 2008). En revanche, les effets directs d'une rupture de cette barrière n'ont pas été développés. Les facteurs pouvant engendrer une telle rupture sont multiples : pathogènes, facteurs pro-angiogéniques, cellules immunitaires et inflammation etc. Suite à la désorganisation de la BHE, se traduisant par une augmentation de la perméabilité vasculaire, les cellules endothéliales sont directement impliquées. C'est toute l'unité neurovasculaire qui est alors affectée. Par exemple, l'ischémie tissulaire après accident vasculaire cérébral génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui entraînent notamment la délocalisation des complexes adhésifs des JS (Obermeier et al., 2013). L'ensemble de ces actions promeut un relâchement des jonctions endothéliales et une fuite de protéines plasmatiques, voire de pathogènes, dans le tissu interstitiel cérébral, conduisant

alors à une réponse inflammatoire. Une rupture de la BHE résulte également en une dérégulation de la balance des ions et autres produits métaboliques (Obermeier et al., 2013). Conjointement avec les ROS et les déficits métaboliques, ceci engendre la dysfonction neuronale, pouvant conduire ultimement à leur mort.

III Les jonctions endothéliales cérébrales

III.1 Organisation générale

Comme évoqué précédemment, à l'état de repos, la majorité des échanges implique des phénomènes de passage transcellulaire. En condition pathologique en revanche, la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire les mécanismes engageant les jonctions inter-endothéliales, est responsable des échanges entre compartiment sanguin et tissu environnant. A l'inverse des fenestrations observées dans le rein ou le foie, les jonctions inter-endothéliales des capillaires cérébraux sont particulièrement resserrées. Dans ce sens, la BHE possède une résistance électrique transendothéliale comprise entre $1500\text{-}2000\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, ce qui la rapproche alors plus d'un épithélium ($1500\ \Omega\cdot\text{cm}^2$) que d'un endothélium classique ($200\ \Omega\cdot\text{cm}^2$) (Butt et al., 1990; Huber et al., 2001b).

Afin d'assurer cette sélectivité de passage, deux types de verrou sont présents au niveau des jonctions inter-endothéliales : les JA et les JS (Mehta and Malik, 2006). Toutes deux reposent sur l'interaction cellule-cellule de protéines d'adhérence transmembranaires reliées au cytosquelette. La force d'interaction entre ces protéines transmembranaires, et donc de fait l'étroitesse de l'espace inter-endothélial, sont régulées par des paramètres tels que les forces physiques exercées par le flux sanguin, ou bien les facteurs biologiques environnants (cytokines, facteurs de croissance) (Yuan and Rigor, 2010). *Sensu stricto* il n'y a pas de délimitation spatiale marquée entre ces deux types de jonctions, celles-ci sont davantage entrecroisées tout au long des jonctions entre cellules, mais par souci de clarté nous décrirons ces jonctions de façon séparée.

III.2 Les jonctions serrées

III.2.i Morphologie générale

La taille moyenne des pores de diffusion passive des JS est de 1 nm (Mehta and Malik, 2006), cela en fait la barrière la plus étanche de l'arbre vasculaire. L'observation par microscopie électronique de ces structures est riche d'information et met en évidence des zones appelées points focaux (*kissing points*), caractéristiques des JS. Dans ces zones, les deux feuillettes des

membranes plasmiques de cellules endothéliales adjacentes sont en apposition intime, bloquant ainsi tout passage paracellulaire (Mehta and Malik, 2006). De ce fait, ces jonctions sont davantage enrichies dans les vaisseaux constituant la BHE ou la barrière hémato-rétinienne (Hawkins and Davis, 2005). Elles occupent une position apicale, c'est-à-dire orientée vers la lumière du capillaire. De façon générale, les JS peuvent être simplifiées en analysant les interactions de trois familles de protéines transmembranaires: les TAMPs, les claudines et les JAMs (Figure 8) (Bauer et al., 2014).

III.2.ii Les protéines TAMPs et la perméabilité paracellulaire des petites molécules

Les protéines TAMPs (*Tight junction-Associated MARVEL Proteins*) sont caractérisées par un domaine MARVEL (*Myelin And lymphocyte Related-protein for VEsicle trafficking and membrane Link*) de 130 résidus structuré en quatre hélices transmembranaires et connu, comme son nom l'indique, dans le trafic vésiculaire et la régulation des JS (Yaffe et al., 2012).

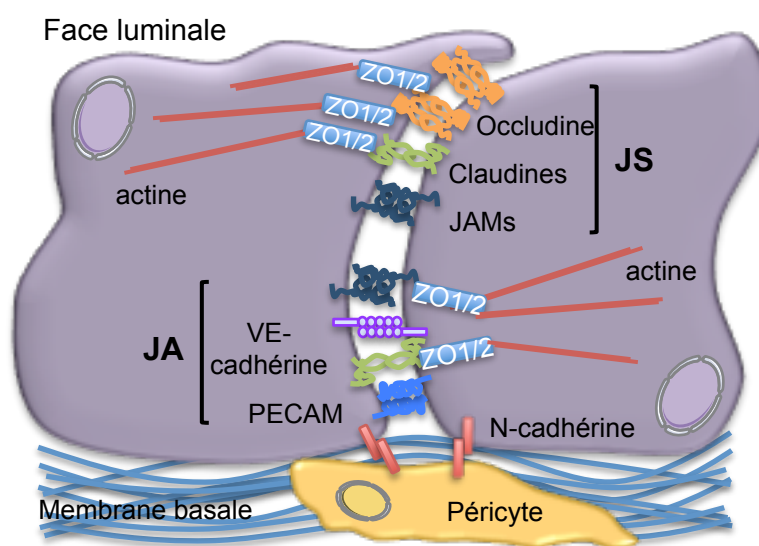


Figure 8: Les jonctions endothéliales. Représentation des jonctions serrées (JS) et adhérentes (JA) entre deux cellules endothéliales. Les protéines transmembranaires sont liées au cytosquelette d'actine via les protéines ZOs. (Adapté de Treps et al., 2013).

a) Structure de l'occludine

Parmi les protéines TAMPs, la mieux caractérisée reste l'occludine (Furuse et al., 1993), une protéine à quatre domaines transmembranaires de type MARVEL. L'occludine possède également deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig), une longue partie carboxy-terminale (C-terminale) et une petite extrémité amino-terminale (N-terminale) qui sont toutes deux cytoplasmiques. Le domaine MARVEL mentionné précédemment permet la localisation de l'occludine aux JS sous forme d'oligomère. Cette propension à s'oligomériser en *cis*, donc au sein de la même cellule, provient de l'interaction entre neuf acides aminés aromatiques dont six sont portés par les domaines MARVEL (Yaffe et al., 2012). Les deux

domaines extracellulaires sont eux impliqués dans des interactions en *trans*, c'est-à-dire avec les occludines de deux cellules endothéliales adjacentes (Bauer et al., 2014).

b) Modifications post-traductionnelles de l'occludine

Du point de vue fonctionnel, l'occludine est une protéine de régulation dynamique dont la présence à la membrane est corrélée avec une augmentation de la résistance électrique transendothéliale. L'expression ectopique de l'occludine de poulet dans des cellules épithéliales canines (MDCK) augmente la résistance électrique (McCarthy et al., 1996). A l'inverse, quelque soit la taille ou la charge des molécules considérées, la perméabilité paracellulaire est accrue lorsque l'extrémité C-terminale de l'occludine est mutée ; suggérant ainsi l'implication de partenaires cytoplasmiques (McCarthy et al., 1996). En effet, la queue C-terminale de l'occludine interagit directement avec les protéines ZO (*Zonula Occludens*) -1, -2 et -3 (Furuse et al., 1994), qui médient la liaison avec le cytosquelette d'actine (Wittchen et al., 1999). Il est également intéressant de mentionner que l'extrémité N-terminale de l'occludine interagit avec l'enzyme E3 ubiquitine ligase Itch (Traweger et al., 2002) qui, en réponse au facteur pro-perméabilité VEGF, promeut la dégradation de l'occludine (Murakami et al., 2009). En outre, l'inhibition de la gamma-sécrétase ou l'activation de la voie Notch1/HES-1 empêche cette dégradation et contrecarre l'altération de la BHE lors d'ischémies cérébrales (Zhang et al., 2013). L'absence de l'occludine au niveau des JS diminue la force d'interaction cellule-cellule et augmente par conséquent la perméabilité vasculaire.

De façon intéressante, les résidus tyrosine, sérine et thréonine (Dorfel and Huber, 2012) de la queue cytoplasmique de l'occludine peuvent être la cible de protéines kinases et phosphatases. Différentes équipes ont en effet associé la réduction du flux sanguin, observée lors d'atteintes ischémiques cérébrales chez le rat, avec l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines de la partie C-terminale de l'occludine (Takenaga et al., 2009; Walsh et al., 2011). Ce mécanisme de phosphorylation est concomitant avec l'activation de la kinase Src, et peut être inhibé par la phosphatase PP2A. La phosphorylation de résidus tyrosine de l'occludine engendre la dissociation de ZO-1 et le désassemblage des JS, conduisant alors à des vaisseaux anormalement perméables (Elias et al., 2009; Rao et al., 2002). De façon intéressante, il semble exister un lien entre JA et JS dans ce processus. En effet, la VE-cadhérine, un acteur majeur des JA (voir partie III.3 de ce chapitre) active la voie de signalisation Tiam1/Rac1 en réponse aux contraintes de cisaillement dans des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux bovins (BMvEC) (Walsh et al., 2011). Rac1 active

en retour la protéine tyrosine phosphatase PTP qui hydrolyse les groupements phosphates sur les tyrosines de l'occludine. Ceci entraîne alors une stabilisation de l'occludine au niveau des JS et un renforcement de la barrière endothéliale (Walsh et al., 2011).

c) Les mutations de l'occludine

L'occludine apparaît donc comme un acteur majeur des JS et de la régulation de la perméabilité vasculaire. En revanche, les cellules endothéliales dépourvues de cette molécule exhibent des JS morphologiquement normales (Saitou et al., 2000). De manière intéressante, les souris invalidées pour l'expression de l'occludine sont viables mais présentent de multiples anomalies, dont une calcification du cerveau. Ce symptôme existe également dans un désordre neurologique chez l'Homme, la BLC-PMG (*Band-Like Calcification with simplified gyration and Polymicrogyria*) qui est due à des mutations de sites de phosphorylation ou des mutations faux-sens engendrant des délétions de domaines de l'occludine (O'Driscoll et al., 2010). Des expériences d'expression ectopique de mutants ponctuels de l'occludine dans des cellules MDCK ont mis en avant l'importance des résidus tyrosines Y398 et Y402 dans l'interaction avec les ZO et le cytosquelette d'actine (Elias et al., 2009). Cependant, le fait que la structure générale des JS soit conservée dans les souris déficientes pour l'occludine suggère que d'autres protéines assurent cette fonction, sans pour autant pouvoir compenser totalement son absence. Parmi les autres membres de la famille TAMP, notons la tricelluline (Ikenouchi et al., 2005) et MarvelD3 (Steed et al., 2009).

d) La tricelluline et MarvelD3

La tricelluline, initialement découverte dans les JS des cellules épithéliales mammaires de souris (Eph4) (Ikenouchi et al., 2005), est structuralement semblable à l'occludine, en particulier sa liaison à ZO-1 par la partie C-terminale. La tricelluline est majoritairement enrichie aux jonctions JS entre trois cellules épithéliales, par comparaison à l'occludine qui est elle exprimée uniformément dans les JS (Figure 9A). Il a été démontré dans des cellules épithéliales (Masuda et al., 2011) et endothéliales (cerveau et rétine) (Iwamoto et al., 2014; Sohet et al., 2015) que la tricelluline est accumulée au niveau des JS et co-localise avec la protéine cytoplasmique LSR/anguline-1 (*Lipolysis-Stimulated Receptor*). Le mode d'assemblage précis de LSR et de la tricelluline (Masuda et al., 2011) n'est pas encore élucidé, mais il apparaît que la phosphorylation par JNK1 du résidu sérine S288 de LSR (Nakatsu et al., 2014) contribuerait à restreindre la localisation du complexe LSR/tricelluline aux JS partagées entre trois cellules. En effet, la transfection de cellules épithéliales

mammaires EpH4 avec une version mutée de LSR (S288A) provoque une répartition de LSR et tricelluline aux JS indépendamment du nombre de cellules voisines (Figure 9B) (Nakatsu et al., 2014). De façon intéressante, l'inactivation homozygote de LSR est létale à l'état embryonnaire, bien qu'aucun défaut structural des JS ne soit détecté. A E14.5, lorsque la BHE est normalement imperméable aux traceurs délivrés par voie intraveineuse, les embryons LSR^{-/-} présentent une perméabilité accrue au traceur sulfo-NHS-biotine (446 Da), contrairement aux embryons sauvages ou hétérozygotes (Sohet et al., 2015). En revanche, la BHE des embryons invalidés pour LSR reste imperméable aux macromolécules telles que l'albumine, suggérant alors que ces dernières emprunteraient d'avantage les voies transcellulaires. LSR apparaît donc comme un acteur crucial pour la maturation et l'intégrité de la BHE, et en particulier dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire aux petites molécules.

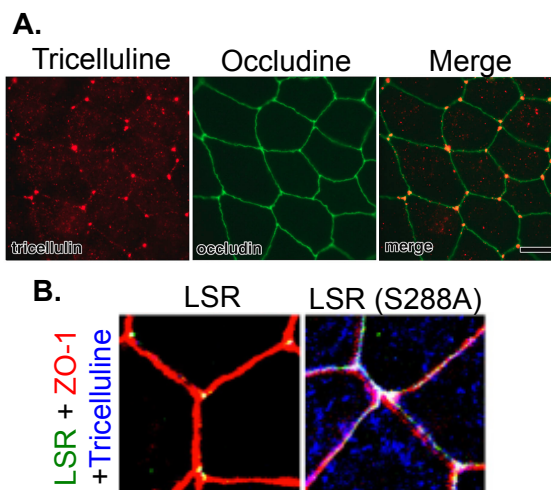


Figure 9. La famille des TAMPs dans les jonctions serrées. A. Localisation de la tricelluline et de l'occludine dans des cellules épithéliales mammaires de souris EpH4 (Ikenouchi et al., 2005). **B.** Interactions entre LSR sauvage ou muté sur la Sérine 288 (S288A), et la tricelluline dans les cellules EpH4. ZO-1 marqueur des jonctions serrées. (Nakatsu et al., 2014).

MarvelD3 possède une structure similaire à l'occludine, avec laquelle elle colocalise dans les cellules épithéliales cornéennes (HCE) et d'adénocarcinome humaine (Caco-2) (Steed et al., 2009). De façon semblable à l'occludine et la tricelluline, son extinction dans les cellules Caco-2 par ARN interférent n'affecte pas la formation des JS. En revanche, la résistance électrique transendothéliale est augmentée après déplétion de MarvelD3, suggérant une implication dans la perméabilité paracellulaire aux ions (Steed et al., 2009).

Ainsi, conjointement ces trois membres de la famille des TAMPs régulent différents aspects de la perméabilité paracellulaire. Il serait intéressant d'analyser les phénotypes lorsque l'expression de deux, voire des trois protéines est abolie, afin de déterminer s'il existe réellement un mécanisme de compensation.

III.2.iii Les claudines

Découvertes en 1998 par l'équipe de S. Tsukita, les claudines-1 et -2 sont caractérisées par leur localisation au niveau des JS. Elles possèdent par ailleurs des similarités structurales avec l'occludine, décrite auparavant par le même groupe (Furuse et al., 1998). Actuellement, la famille des claudines s'est considérablement élargie avec 27 membres différents identifiés chez l'Homme et la souris (Mineta et al., 2011). Les claudines sont des protéines à quatre domaines transmembranaires et deux petits domaines extracellulaires permettant leur liaison avec d'autres claudines en *trans*. Selon l'organe ou le type de cellule considéré, le profil d'expression des claudines est différent. De nombreuses études ont mis en lumière leur rôle instrumental dans la formation des JS ; nous décrirons ici le cas de la claudine-5 qui est de loin la plus exprimée dans les cellules endothéliales cérébrales (Nitta et al., 2003).

a) L'invalidation de la claudine-5

Du point de vue génétique, les souris homozygotes invalidées pour la claudine-5 meurent dans les 10 heures post-naissance (Nitta et al., 2003). Dans ces embryons, aucun défaut de la vasculogenèse et de l'angiogenèse n'est observé, comme en témoigne le marquage pan-endothélial normal de CD31 (PECAM-1), ou l'absence d'œdèmes vasculaires visibles. De la même façon, l'intégrité des JS est préservée, puisqu'au sein de ces jonctions, la claudine-12 pourrait se substituer à la claudine-5. En revanche, lorsque la fonction de barrière des JS est testée, un défaut majeur de la BHE est noté pour les molécules de moins de 0.8 kDa (Figure 10) (Nitta et al., 2003). Ainsi les souris dénuées de claudine-5 présentent des JS dont la structure est intacte, bien que les propriétés fines de barrière soient perdues, et ceci même si la

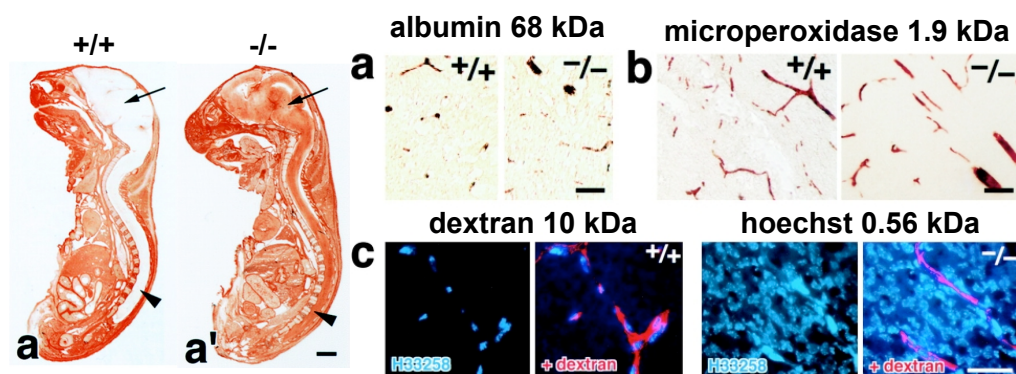


Figure 10. La place de la claudine-5 dans les jonctions serrées. Embryon de souris **a.** sauvage (+/+) ou **a'.** invalidé pour la claudine-5 (-/-) et perfusé avec un composé biotinylé de 0.44 kDa à E.18.5. Les flèches montrent que les embryons -/- ont un défaut de la BHE. **a.-c.** Section cérébrale d'embryons de souris perfusés avec des marqueurs de différentes taille moléculaire. La claudine-5 restreint le passage aux petites molécules <0.8 kDa. (D'après Nitta et al., 2003).

claudine-12 prend le relais. À noter que les claudines-12 et -3 sont également exprimées par les vaisseaux cérébraux (Schrade et al., 2012), mais dont les rôles précis sont mal décrits au regard de la claudine-5.

b) Modifications post-traductionnelles de la claudine-5

La claudine-5, tout comme l'occludine, est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles dans sa partie cytoplasmique. Récemment, l'expression ectopique de la claudine-5 dans des cellules HeLa a permis de mettre en évidence la présence de poly-ubiquitinylation sur le résidu lysine K199. Cette modification engendre sa dégradation via le protéasome et module ainsi son niveau d'expression et sa localisation cellulaire (Mandel et al., 2012). D'autre part, des études portant sur le virus du VIH montrent que la protéine virale gp120 altère la BHE, et en particulier diminue la résistance électrique des cellules endothéliales cérébrales hBMEC (Kanmogne et al., 2007). Ce processus, inhibé par la staurosporine, implique la PKC et permet la migration monocyttaire au travers de la BHE. Par ailleurs, gp120 induit une déstabilisation de la claudine-5 dans les cellules endothéliales cérébrales de souris bEnD3 impliquant sa phosphorylation sur le résidu thréonine T207 par la Rho-Kinase (Yamamoto et al., 2008).

La diversité des claudines provient essentiellement de leur extrémité C-terminale cytoplasmique qui possède un motif de liaison protéique PDZ (PSD95 : *Post Synaptic Density protein*, Dlg1 : *Drosophila-disc large tumor suppressor*, ZO-1). Dès lors, ceci suggère des interactions avec des partenaires cytoplasmiques. Dans ce sens, des expériences d'immunoprécipitation dans des cellules MDCK indiquent que les claudines lient les protéines ZO-1 à -3 par leur queue C-terminale (Itoh et al., 1999), dont le rôle sera développé par la suite (paragraphe III.2.v.).

III.2.iv La famille des JAMs

Les JAMs, pour *Junction Adhesion Molecules* appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Les JAMs classiques sont au nombre de trois, JAM-A, -B et -C, et possèdent deux domaines extracellulaires de type Ig (V_H et C_2), un unique domaine transmembranaire, et une courte extrémité C-terminale cytoplasmique comportant un motif PDZ (Bauer et al., 2014). Via ce motif PDZ, la partie intracellulaire de JAM-A peut lier les molécules cytoplasmiques de la famille ZO (Yuan and Rigor, 2010) et les protéines de polarité PAR-3 et -6 impliquées dans la fasciculation de l'actine (Ebnet et al., 2003). Le

domaine V_H permet de créer des homodimères portés par la même cellule (en *cis*), et former des contacts homotypiques en *trans* (Bazzoni et al., 2000; Severson and Parkos, 2009). Il faut noter que seules JAM-A et -C sont exprimées dans l'endothélium cérébral (Aurrand-Lions et al., 2001).

a) Les fonctions biologiques des JAMs dans la barrière endothéliale

Le rôle de JAM-A a initialement été étudié dans l'épithélium. *In vitro*, des cellules humaines d'épithélium intestinal (SK-CO15) dépourvues de JAM-A présentent une augmentation de la perméabilité au Dextran et une résistance électrique diminuée (Mandell et al., 2005). Les souris dont l'expression de JAM-A est abolie, n'ont qu'un phénotype modéré avec un défaut de la perméabilité cornéenne (Kang et al., 2007) et une inflammation chronique du tractus intestinal caractérisée par une perméabilité paracellulaire excessive (Laukoetter et al., 2007). En dehors de travaux portant sur les formes solubles de JAM-A, aucune étude n'a encore clairement établi le rôle de JAM-A dans la perméabilité endothéliale. Par exemple, le taux de forme soluble de JAM-A, détecté dans le sang périphérique, augmente dans le sérum de patients atteints de pathologies associées à une inflammation vasculaire telles que hypertension et athérosclérose (Cavusoglu et al., 2007; Ong et al., 2009). L'augmentation de JAM-A soluble dans des conditions inflammatoires n'est en revanche pas observée *in vitro* dans des cellules endothéliales microcérébrales humaines (hCMEC) qui produisent cette forme à taux constants, ni pour des patients atteints de scléroses multiples, ou sujets à des atteintes ischémiques, c'est-à-dire des pathologies où la BHE est endommagée (Haarmann et al., 2010). De fait, le rôle exact de cette forme soluble n'est pas encore clairement établi, mais il semblerait qu'elle puisse contribuer à limiter l'extravasation des leucocytes. Il existe également chez l'Homme une maladie rare, appelée syndrome de pseudo-infection intra-utérine congénitale (*TORCH syndrome*), caractérisée par des hémorragies intracérébrales. En 2010, une étude de liaison génétique a associé ce syndrome à la mutation non-sens de la JAM-C générant alors une protéine tronquée (Mochida et al., 2010).

L'étude des protéines transmembranaires composant les JS montre qu'ensemble elles organisent l'adhérence entre cellules endothéliales et assurent un contrôle fin des mouvements paracellulaires, bien qu'aucune ne soit complètement indispensable à l'établissement des JS. Par ailleurs, elles partagent et regroupent de nombreux partenaires cytoplasmiques sous la membrane plasmique.

III.2.v Partenaires cytoplasmiques des jonctions serrées : la famille des MAGUKs

Jusqu'à présent les protéines ZO (*Zonula Occludens*) ont été citées à plusieurs reprises soulignant de fait leur grande importance dans les jonctions endothéliales. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines MAGUK (*Membrane Associated GUanylate Kinase*) qui forment des échafaudages sous-membranaires coalesçant ainsi une multitude de protéines partenaires (Dimitratos et al., 1999; Funke et al., 2005). Cette interaction vient du fait qu'elles possèdent plusieurs domaines PDZ et un domaine SH3 (*Src-Homology domain 3*) suivi d'un motif GUK (*GUanylate Kinase*). Ces différents motifs sont impliqués dans les interactions avec des protéines transmembranaires, cytoplasmiques, nucléaires et du cytosquelette, ce qui permet de transmettre de nombreux signaux au sein de la cellule (Bauer et al., 2014). Plusieurs régions uniques (U) sont présentes à l'extrémité C-terminale des ZO, et pourraient moduler leur localisation intracellulaire et leur propriété d'agrégation protéique (Fanning et al., 2007).

a) Les protéines ZO

En 1986, ZO-1 fut la première décrite comme enrichie aux JS de nombreux épithéliums (Stevenson et al., 1986). Il existe trois ZO (-1, -2 et -3) exprimées conjointement par les cellules épithéliales et endothéliales, à l'exception de la ZO-3 restreinte aux cellules épithéliales (Inoko et al., 2003). Ces protéines de haut poids moléculaire (225 kDa) interagissent avec l'extrémité C-terminale de protéines d'adhérence cellule-cellule, telles que l'occludine (McCarthy et al., 1996), la tricelluline (Ikenouchi et al., 2005), la majorité des claudines (Itoh et al., 1999) et JAM-A (Yuan and Rigor, 2010). ZO-1 lie les filaments d'actine soit de façon directe (Itoh et al., 1997), soit de manière indirecte via la protéine d'échafaudage 4.1R (Mattagajasingh et al., 2000), ou via les protéines de liaison à l'actine telles que la cortactine (Katsube et al., 1998) et la spectrine (Mattagajasingh et al., 2000). De façon intéressante, les protéines ZO expriment toutes des séquences d'import et d'export nucléaire, suggérant un rôle dans la signalisation nucléaire (Balda et al., 2003). En effet, ZO-1 peut notamment séquestrer des facteurs de transcription aux JS tels que ZONAB (*ZO-1-associated Nucleic Acid-Binding protein*), inhibant ainsi la prolifération cellulaire (Sourisseau et al., 2006). De façon similaire, ZO-2 peut retenir le facteur de transcription AP1 (*Activator Protein-1*) hors du noyau, l'empêchant alors d'agir avec ses cibles transcriptionnelles (Betanzos et al., 2004), ou d'inhiber la cycline D1 (Balda and Matter, 2003).

En dépit de leur haut degré de similarité, les protéines ZO semblent avoir des rôles différents (Bauer et al., 2014). Les souris déficientes en ZO-1 (Katsuno et al., 2008) ou ZO-2 (Xu et al.,

2008) meurent à l'état embryonnaire, dû à une prolifération anormalement faible, une apoptose massive et des défauts du plexus vasculaire (notions développées dans la partie II). En revanche, l'absence de phénotype évident pour les souris déficientes en ZO-3 (Xu et al., 2008) laisse à penser que cette protéine pourrait être remplacée par une autre ZO.

L'ensemble des interactions protéiques présentées ici n'est pas exhaustif. En effet, comme indiqué précédemment, les protéines ZO ont un grand nombre de partenaires cellulaires. ZO-1 et ZO-2 en particulier sont instrumentales pour la formation adéquate des JS et leurs interactions avec le cytosquelette.

b) Les protéines MAGI

D'autres protéines cytoplasmiques de la sous-famille des MAGI (*MAGUK with Inverted orientation*) se localisent également aux JS (Bauer et al., 2014). Tout comme les ZO, ce sont des protéines adaptatrices avec six domaines PDZ, un module GUK et deux motifs WW en position C-terminale qui lient les zones riches en proline (Bauer et al., 2014). Parmi les trois membres identifiés à l'heure actuelle, seule MAGI-1 et ses variants d'épissage sont retrouvés dans les cellules endothéliales cérébrales (Laura et al., 2002). MAGI-1 participe, au même titre que ZO-1, à la mise en place des JS via son interaction avec ESAM (*Endothelial cell Selective Adhesion Molecule*) (Wegmann et al., 2004) et à leur maturation de façon Rho-dépendante (Kimura et al., 1996). ESAM recrute MAGI-1 aux JS et promeut ainsi la formation de jonctions matures et complexes (Nasdala et al., 2002). MAGI-1 peut également interagir directement avec la β -caténine, et ainsi colocaliser avec la VE-cadhérine (Sakurai et al., 2006), au niveau des JA. MAGI-1 lie la GEF1-PDZ qui permet d'activer Rap1, une protéine GTPase impliquée dans la stabilisation et la maturation des JA. Au niveau de ces jonctions, la VE-cadhérine active Rap1, de façon dépendante de MAGI-1, afin de stabiliser les JA endothéliales (Sakurai et al., 2006). Ces données soulignent encore une fois les connexions entre JS et JA et notamment par l'entremise de la VE-cadhérine.

III.3 Les jonctions adhérentes

Les JA et JS sont interconnectées tant sur le plan physique que fonctionnel. Temporellement, il semble que la formation des JA précède celle des JS, et comme on l'a vu précédemment les protéines ZO-1 et -2 interviennent dans ce processus (Ikenouchi et al., 2007). Les JA reposent sur différents partenaires que nous décrirons un à un dans le contexte de l'endothélium

cérébral. En effet, les cellules endothéliales peuvent former différents types de vaisseaux et présentent donc des variations dans la composition de ces jonctions (Orsenigo et al., 2012). Schématiquement, au sein des JA il peut être différencié plusieurs molécules d'adhérence, les JAMs, qui ont donc été décrites précédemment, la VE-cadhérine et PECAM (Figure 8).

III.3.i La VE-cadhérine, une cadhérine instrumentale de l'endothélium

Avec E. Dejana, P. Carmeliet fut le premier en 1999 à réaliser des souris invalidées pour la VE-cadhérine en introduisant un codon stop dans le cadre de lecture du gène, conduisant ainsi à une délétion des exons 3 à 7 (Carmeliet et al., 1999). Jusqu'à E8.5 les souris sauvages ou délétées pour la VE-cadhérine sont identiques avec une différenciation normale des angioblastes (sujet développé dans le chapitre II). En revanche, les animaux invalidés ne parviennent pas à former l'arbre vasculaire primitif par connexion entre cellules endothéliales. Ces animaux meurent à l'état embryonnaire à E9.5-10, dû à des défauts majeurs de l'angiogenèse dans l'ensemble des organes considérés (Carmeliet et al., 1999). La VE-cadhérine apparaît donc comme indispensable à l'établissement des vaisseaux et à leur maturation. Nous verrons par la suite que cette action est provoquée, entre autre, par son interaction avec de nombreux partenaires cytoplasmiques.

a) Structure des cadhérines classiques

Les cadhérines classiques se découpent en trois domaines majeurs : le domaine extracellulaire, une partie transmembranaire, et enfin une queue intracellulaire (Figure 11). Selon un mode privilégié, les cadhérines interagissent d'abord en *cis* pour former des clusters sur une même cellule, puis s'associent avec d'autres cadhérines en *trans* afin de renforcer la jonction (Shapiro et al., 1995). Une fois engagée la jonction réalisée reste stable tout en pouvant se dissocier rapidement pour s'adapter aux modulations externes, tels que flux sanguin (Orsenigo et al., 2012) et facteurs solubles (Gavard, 2009). L'extrémité extracellulaire est constituée de cinq répétitions de type cadhérines, à motif *Ig-like* de 110 acides aminés chacun, appelé domaine EC (*Extracellular Cadherin*) dont la structure est en conformation ouverte et opérationnelle en présence de calcium (Gavard, 2009). Au sein des cadhérines dites classiques deux sous-groupes peuvent être différenciés en fonction de la structure de leur premier domaine cadhérine EC1. Le domaine EC1 comporte une large poche hydrophobe dans les cadhérines classiques de type 2, telle la VE-cadhérine, et qui est plus étroite pour le type 1 (Patel et al., 2006). C'est la nature des acides aminés en charge de

l'interaction homophile qui diverge entre type 1 et type 2. Dans le cas de la VE-cadhérine, l'interaction *cis* ou *trans* est notamment portée par les résidus tryptophanes conservés (W2 et W4).

b) Les modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine

La queue C-terminale de la VE-cadhérine peut être sujette à de nombreuses régulations post-traductionnelles qui modulent sa localisation, sa dégradation et son interaction avec les caténines (Dejana et al., 2008). Ceci passe notamment par des phosphorylations sur des résidus tyrosines et sérines, des ubiquitinylations et des clivages protéiques. Sur la base de sa séquence en acides aminés, 22 résidus potentiels de phosphorylation sont portés par le domaine intracellulaire, autant de combinaisons différentes pouvant modifier la VE-cadhérine et moduler les interactions avec ses partenaires.

Parmi ces sites, cinq tyrosines (Y645, Y658, Y685, Y731 et Y733) et une sérine (S665) sont documentées pour leurs répercussions fonctionnelles sur la perméabilité vasculaire et la transmigration leucocytaire (Figure 11A) (Gavard and Gutkind, 2006; Orsenigo et al., 2012; Potter et al., 2005; Turowski et al., 2008; Wallez et al., 2007). Les tyrosines Y658 et Y731 sont phosphorylables directement par la kinase Src (Potter et al., 2005). L'expression ectopique de constructions phospho-mimétiques (Y-D) de la VE-cadhérine dans des cellules ovariennes de hamster (CHO) entraîne une diminution de la fonction de barrière par rapport à la construction sauvage (Potter et al., 2005). De même, la mutation de l'un ou l'autre de ces résidus prévient l'association des caténines p120 et β -caténine (partenaires décrits dans le paragraphe suivant) à la VE-cadhérine (Potter et al., 2005). Cette molécule d'adhérence n'ayant alors plus de lien avec le cytosquelette d'actine est déstabilisée, et la cellule acquiert un profil migratoire et invasif. En outre, notre laboratoire a montré dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) et de souris (SVEC : *SV-40 immortalized Endothelial Cells*) que la VE-cadhérine peut être internalisée dans des vésicules de clathrines après l'action du VEGF. Ce facteur via son récepteur VEGFR-2 active la kinase Src qui déclenche également la voie de signalisation Vav2/Rac/PAK. Cette voie aboutit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la sérine S665 (Gavard and Gutkind, 2006) et à son internalisation dans des vésicules de clathrines (Figure 11B) (Gavard and Gutkind, 2006; Hebda et al., 2013).

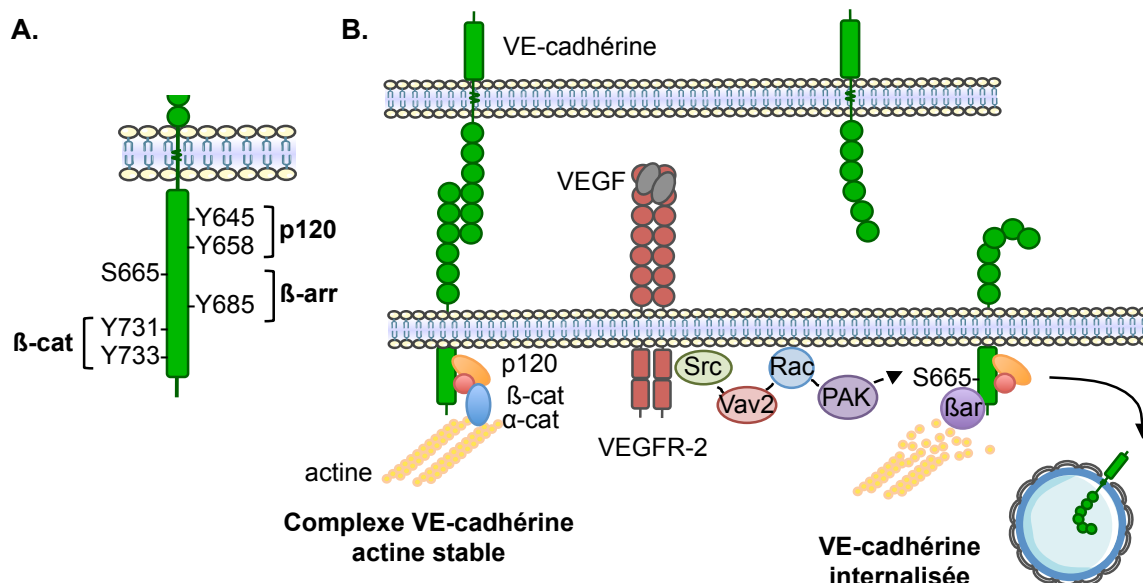


Figure 11. La VE-cadhérine, une protéine régulée par phosphorylation. A. Sites potentiels de phosphorylation de la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine. Sont indiqués les sites de fixation de la β -caténine (β -cat), de la caténine p120 et la de la β -arrestine (β -arr). **B.** Mécanisme d'internalisation de la VE-cadhérine sous l'effet du VEGF et de son récepteur VEGFR-2. La voie Src/Vav2/Rac/PAK conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le résidu sérine S665, le recrutement de la β -arrestine (β ar) et l'internalisation de la VE-cadhérine dans des vésicules de clathrines.

Dans le même sens, l'ubiquitinylation de la VE-cadhérine apparaît comme une autre modification post-traductionnelle de la VE-cadhérine provoquant son internalisation. Cette observation a été conduite *in vivo* par traitement de souris avec la bradykinine, un vasodilatateur. Dans le même modèle expérimental, il a été démontré que l'augmentation de l'ubiquitinylation de la VE-cadhérine dépend de la phosphorylation sur des résidus tyrosine, car l'ubiquitinylation est perdue dans les souris mutantes Y658F et Y685F (Orsenigo et al., 2012).

Enfin, la VE-cadhérine peut également être régulée par clivage de sa partie extracellulaire, et retrouvée soluble dans le sérum dans des pathologies cancéreuses comme les gliomes (Vilgrain et al., 2013), et inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde ou certaines maladies auto-immunes (Bouillet et al., 2013; Sidibe et al., 2012). Concernant le premier cas, la phosphorylation de la tyrosine Y685 de la VE-cadhérine est retrouvée dans les vaisseaux tumoraux au sein des glioblastomes. Cette phosphorylation induite par la voie VEGF/VEGFR-2/Src conduit à une modification de la VE-cadhérine qui serait alors la cible du clivage protéique de métalloprotéinases matricielles (MMP-2 et -9) (Vilgrain et al., 2013).

c) Les partenaires cytoplasmiques de la VE-cadhérine

L'extrémité cytoplasmique des cadhérines est très conservée, car notamment cruciale pour son interaction avec le cytosquelette d'actine. Cette liaison n'est pas directe mais fait intervenir des molécules de la famille armadillo, appelées caténines (Gavard, 2009). Ces protéines assument une fonction double reconnue, tant sur l'adhérence cellulaire que sur la régulation de la transcription. Les membres p120, α -, β - et γ -caténines portent des motifs répétés armadillo de 42 acides aminés qui leur permettent d'interagir ensemble et de fixer la queue C-terminale des cadhérines (Huber et al., 2001b) (Figure 11B).

L' α -caténine

L' α -caténine existe sous deux formes, une forme monomérique liant préférentiellement le complexe β -caténine/cadhérine, et une forme dimérique associée aux filaments d'actine (Drees et al., 2005). Enfin, l' α -caténine ne peut lier de façon simultanée la β -caténine et l'actine (Yamada et al., 2005), suggérant d'emblé un ou plusieurs partenaires inconnus. Dans ce sens, il a été montré dans des HUVEC que la protéine EPLIN (*Epithelial Protein Lost In Neoplasm*) forme un complexe avec les caténines α et β , et la VE-cadhérine, et contribue à la stabilisation des nouveaux capillaires formés *in vitro* (Chervin-Petinot et al., 2012).

La β -caténine

La β -caténine est un acteur majeur de la voie de signalisation Wnt, en particulier au cours du développement embryonnaire de la drosophile où elle a été initialement caractérisée (Peifer et al., 1992). Cette molécule peut agir en tant qu'hétérodimère avec l' α -caténine, et ainsi être le lien entre la queue C-terminale de la VE-cadhérine et les filaments d'actine, ou agir comme facteur de transcription sous forme monomérique (Huber et al., 1996). Concernant son lien avec les cadhérines, des travaux pionniers indiquent que sa fixation masque une séquence PEST sur la E-cadhérine, associée à l'ubiquitinylation dégradative par le protéasome (Huber et al., 2001a). La β -caténine en se liant aux cadhérines préviendrait alors leur recyclage et leur dégradation. Enfin, de façon plus atypique, la β -caténine peut être S-nitrosylée (C619) dans les cellules endothéliales stimulées par le VEGF. Cette S-nitrosylation dépend de l'activation de l'enzyme e-NOS (*Nitric Oxide Synthase*), qui intervient de façon dépendante du VEGF/VEGFR-2 (Thibeault et al., 2010). De manière intéressante, la perméabilité induite par le VEGF est bloquée dans un modèle de cellules endothéliales aortiques de bovin (BAEC) exprimant une forme mutée non S-nitrosylable de la β -caténine (C619S). Il apparaît en effet que la β -caténine S-nitrosylée se dissocie de la VE-cadhérine, contribuant au désassemblage

des JA et donc ultimement à l'augmentation de la perméabilité (Gavard and Gutkind, 2006; Thibeault et al., 2010).

Comme mentionné précédemment, la β -caténine peut également agir en tant que facteur de transcription. Par ailleurs, les travaux de l'équipe d'E. Dejana en 2008 ont montré l'importance de la VE-cadhérine dans la mise en place des JS (Taddei et al., 2008). L'expression de la VE-cadhérine aux JA permet d'une part de séquestrer la β -caténine sous la membrane et de limiter son interaction avec Foxo1 (*Forkhead box factor 1*) dans le noyau, et d'autre part d'activer la voie PI3K (*PhosphatidyInositol-3-OH-Kinase*)/AKT. AKT phosphoryle à son tour Foxo1 qui se relocalise dans le cytoplasme. Foxo1 ne peut alors plus inhiber la transcription de la claudine-5 qui est donc exprimée et forme les JS (Taddei et al., 2008).

In vivo, les souris dépourvues de β -caténine meurent précocement lors de l'embryogenèse par défaut de mise en place de l'axe antéro-postérieur. Dans ce contexte, des mutants conditionnels ont été développés afin d'étudier l'implication d'une délétion de la β -caténine spécifiquement dans les cellules endothéliales (lignée transgénique Tie2-Cre s'exprimant à partir de E8.5 (Kisanuki et al., 2001)) (Cattelino et al., 2003). Ces mutants conditionnels sont également non viables après E13.5 et présentent, tout comme les souris invalidées pour la VE-cadhérine, un développement vasculaire normal jusqu'à E9.5. Un défaut majeur de la perméabilité apparaît ensuite, engendrant œdèmes, hémorragies et létalité (Cattelino et al., 2003). Les cellules endothéliales isolées de ces embryons présentent des jonctions endothéliales lâches avec un cytosquelette d'actine perturbé et une perméabilité élevée. De façon intéressante, l'importance de la signalisation nucléaire de la β -caténine dans l'établissement précoce (E10.5-15.5) de la BHE a également été démontrée dans des embryons de souris. De plus, des études *in vitro* sur cellules endothéliales cérébrales de souris (MBE) exprimant une construction forçant l'activité transcriptionnelle de la β -caténine de façon indépendante de sa liaison à la VE-cadhérine, induit la surexpression de la Claudine-3 et la répression de Plvap (*Plasmalemmal vesicle associated protein-1*) (Liebner et al., 2008). Ces cellules MBE, qui perdent leur caractère de BHE en culture, se voient alors leurs propriétés de barrière restaurées grâce à l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. L'ensemble de ces travaux souligne ainsi le rôle instrumental de la β -caténine quant à la formation des jonctions endothéliales et la mise en place de la BHE lors du développement.

La γ -caténine

La γ -caténine, appelée également plakoglobine (Cowin et al., 1986), est une protéine moins connue que la β -caténine. La γ -caténine est assemblée aux jonctions uniquement dans des cellules HUVEC en culture et à confluence depuis au moins deux jours. Dans ces mêmes cellules, des expériences d'immunoprécipitation montrent que la γ -caténine est alors préférentiellement utilisée pour assurer le lien entre VE-cadhérine et α -caténine (Lampugnani et al., 1995). De façon intéressante, le complexe impliquant la β -caténine est lui davantage présent dans des jonctions naissantes et stables suggérant une régulation de l'environnement cellulaire sur la β - et γ -caténine (Lampugnani et al., 1995).

La caténine p120

La caténine p120 se lie aux cadhérines par son domaine central armadillo, et à des protéines cytoplasmiques par son extrémité C-terminale. Tout comme pour la β -caténine et la VE-cadhérine, p120 est une protéine indispensable au développement vasculaire. Preuve en est faite par les travaux des équipes d'A. Reynolds et A. Kowalczyk portant sur l'étude de souris transgéniques invalidées de façon conditionnelle pour la caténine p120 (lignée Tie2-CRE) (Oas et al., 2010). Un peu moins de la moitié de ces embryons meurent vers E14.5 avec une létalité associée à un défaut de la densité et de la perméabilité microvasculaire, de même qu'une absence de recrutement de péricytes. Ces défauts sont conjointement liés à une réduction du niveau d'expression membranaire de la VE- et de la N-cadhérine (Oas et al., 2010). De précédentes études *in vitro* menées par ces deux mêmes équipes ont mis en évidence que p120 est un régulateur essentiel de la stabilité des cadhérines à la membrane plasmique. En effet, l'extinction de p120 par ARN interférent dans des cellules épithéliales ou endothéliales conduit à une internalisation des E-, N- et VE-cadhérines, et leur relocalisation aux lysosomes pour dégradation protéolytique (Davis and Reynolds, 2006; Xiao et al., 2003). En effet, p120 masque un domaine atypique d'endocytose, crucial pour la localisation de la VE-cadhérine. Une mutation de ce domaine de fixation (D₆₄₅EE) entraîne un découplage de ces deux protéines et une internalisation constitutive de la VE-cadhérine, qui altère l'intégrité de la barrière endothéliale et le maintien de la résistance électrique transendothéliale. Dans le même sens, p120 peut interagir avec la GEF Vav2 pour activer Rac1 et induire des remaniements du cytosquelette d'actine et exacerbant la déstabilisation des jonctions endothéliales (Herron et al., 2011; Nanes et al., 2012).

Comme la β -caténine, p120 peut également se comporter comme facteur de transcription. En liant Kaiso et/ou Glis2 dans le noyau (Daniel and Reynolds, 1999), p120 inhibe l'activité de

ces répresseurs transcriptionnels dans les cellules endothéliales (Hosking et al., 2007; Zhang et al., 2010). L'inhibition de Kaiso a pour conséquences de limiter les processus inflammatoires médiés par la voie NF- κ B, mais également la répression de certaines protéines membranaires (ICAM-1, VCAM-1 et sélectine-E) utilisées lors de la transcytose des lymphocytes au travers de l'endothélium (O'Donnell et al., 2011). De leur côté, le facteur Glis2 (*Gli-similar 2*) et ses cibles transcriptionnelles ne sont encore que peu documentés. Parmi les cibles de Glis2, nous pouvons mettre en lumière la β -caténine avec laquelle Glis2 s'associerait pour réprimer la transcription de ses cibles (Ke et al., 2015). De façon intéressante, dans un contexte d'hémorragie intracérébrale, l'expression de Glis2 est induite dans les neurones situés autour des zones hémorragiques (Ke et al., 2015).

L'observation des embryons invalidés pour les caténines, et leurs rôles vis-à-vis des cadhérines et du cytosquelette, placent ces molécules au cœur des processus de vasculogenèse et d'angiogenèse.

III.3.ii PECAM-1

La molécule PECAM-1, pour *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (ou CD31), a été identifiée en 1990 dans les plaquettes humaines (Newman, 1994). Son profil d'expression englobe les cellules du lignage hémangioblaste, telles que thrombocytes, neutrophiles, monocytes, certains pools de lymphocytes, et cellules endothéliales⁷ (Newman, 1994).

a) Structure générale et interactions cellulaires

PECAM-1 possède en N-terminal six domaines extracellulaires Ig (type C₂), mais également un domaine unique transmembranaire et une queue C-terminale cytoplasmique. Tout comme les JAMs et l'occludine, les domaines Ig de PECAM-1 permettent des interactions homophiles en *cis* et en *trans* (Holness and Simmons, 1994). PECAM-1 peut aussi lier des ligands par interactions hétérophiles, comme c'est le cas pour l'intégrine α v β 3, CD38, CD177 et certains glucosaminoglycanes (Gandhi et al., 2008). Dans ce contexte, il a été montré dans des fibroblastes de souris (*L cells*) exprimant des taux endogènes de cadhérines très faibles, que la transfection d'une forme mutée de PECAM-1 (Y686F) engendre un changement d'interaction passant d'un mode hétérophile à homophile (Famiglietti et al., 1997). De façon

⁷ nombre estimé à près d'un million pour chacune des cellules endothéliales

intéressante, des études par cytométrie de flux sur des cellules endothéliales ont mis à jour une corrélation inverse entre les niveaux membranaires de PECAM-1 et de VE-cadhérine, au cours de la migration transendothéliale des monocytes (Hashimoto et al., 2011). Dans ce sens, les travaux de l'équipe de F. Lusinskas démontrent que la liaison des neutrophiles et leucocytes sur des HUVEC engendrait une déstabilisation de la VE-cadhérine par activation de Src (Alcaide et al., 2012; Alcaide et al., 2008). Ainsi, ces résultats suggèrent que PECAM-1, qui est également exprimé par les monocytes, est une molécule d'adhérence impliquée dans le contrôle de la migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium.

b) Partenaires et modifications de PECAM-1

Outre les partenaires protéiques que PECAM-1 lie via son domaine extracellulaire, nous avons vu précédemment que la phosphorylation du résidu Y686 module les modes d'interactions en *trans*. Sur cette base, la phosphorylation sur tyrosine de la partie C-terminale de PECAM-1 est augmentée lorsque des cellules HUVEC sont incubées avec des billes conjuguées à des anticorps anti-PECAM-1, plutôt que présentées seules. En utilisant un modèle d'expression ectopique de PECAM-1 sauvage ou mutante dans des cellules mésothéliales humaines (REN ; dépourvues de PECAM-1), il a été montré que la phosphorylation du résidu Y686 est critique pour l'activation de la voie RhoA/ROCK et l'internalisation des conjugués de PECAM-1 (Garnacho et al., 2008). Ceci va subséquentement conduire à l'ouverture des jonctions intercellulaires, la disruption de la barrière endothéliale et la possibilité d'extravasation de leucocytes.

En outre, il a été montré dans les plaquettes que la cystéine C595 peut être palmitoylée et que celle-ci est nécessaire pour localisation de PECAM-1 au niveau de micro-clusters membranaires (Sardjono et al., 2006). Faisant suite à cette étude, la protéine ZDHHC-21 (*Zinc finger Asp-His-His-Cys domain-containing protein*) a été identifiée dans des HUVEC, comme responsable de cette palmitoylation. En effet, son extinction conduit à une réduction de 50% de l'expression membranaire de PECAM-1 (Marin et al., 2012).

L'étude de cellules HUVEC a révélé que la queue cytoplasmique de PECAM-1 sert également de plateforme au recrutement de molécules de la famille armadillo (β et γ -caténines) afin de lier le cytosquelette d'actine. Dans des cellules endothéliales HUVEC en migration à faible confluence, la phosphorylation de PECAM-1 par la PKC sur la sérine S674 augmente l'affinité de liaison de la γ -caténine à PECAM-1 (Ilan et al., 2000). A l'inverse dans des cellules confluentes, cette phosphorylation est diminuée et donc la γ -caténine s'associe

préférentiellement à la VE-cadhérine afin de renforcer les JA (Ilan et al., 2000; Lampugnani et al., 1995).

c) Rôles biologiques de PECAM-1

L'étude des souris invalidées pour PECAM-1 révèle que cette molécule n'est pas aussi cruciale que la VE-cadhérine pour assurer une embryogénèse adéquate (Cao et al., 2009; Carmeliet et al., 1999). En effet, les souris dépourvues de PECAM-1 sont viables mais présentent une diminution du recrutement des neutrophiles aux zones d'inflammation, une propension réduite au développement de tumeurs sous-cutanées et un nombre faible de filopodes endothéliaux (Cao et al., 2009).

Comme mentionné précédemment, PECAM-1 est une molécule exprimée fortement dans les cellules endothéliales, et fonctionne au sein d'un complexe en tant que détecteur des forces mécaniques générées par des modifications du flux sanguin (Tzima et al., 2005). Un changement de conformation de la queue cytoplasmique de PECAM-1 permettrait d'activer Src et de moduler la fonction des intégrines (Glen et al., 2012). Des souris invalidées pour PECAM-1 (Tzima et al., 2005), ou des cellules HUVEC dépourvues de cette molécule (Glen et al., 2012), présentent des défauts d'activation de la voie pro-inflammatoire NF- κ B. Il faut indiquer qu'une dérégulation pathologique du flux sanguin est observée dans l'athérosclérose, et que ce phénomène amplifie la maladie en activant des voies pro-inflammatoires. Dans ce sens, des souris invalidées pour PECAM-1 (Tzima et al., 2005), ou des cellules HUVEC dépourvues de cette molécule (Glen et al., 2012), présentent des défauts d'activation de la voie NF- κ B. D'autre part, les forces laminaires engendrent l'association de la β -caténine à la partie C-terminale de PECAM-1, qui pourrait alors réguler l'expression transcriptionnelle de nombreux gènes. Ainsi, bien que la compréhension fine des différents acteurs moléculaires impliqués dans ce processus n'est pas encore complète, PECAM-1 apparaît comme indispensable dans cette mécanotransduction.

Les études des JA et JS soulignent la grande complexité d'organisation de chacune de ces structures adhésives. En outre, un autre niveau de complexité s'ajoute au fait que certains des composants sont partagés, et que la formation des JA influe sur la formation des JS. Ainsi, selon les facteurs environnementaux présents, et de ce fait l'état de la cellule endothéliale, il faudra ajouter la composante temporelle pour l'étude des jonctions endothéliales.

III.4 Les autres jonctions de l'unité neurovasculaire

III.4.i La N-cadhérine

Comme expliqué dans la partie II de ce chapitre, l'unité neurovasculaire est composée des cellules endothéliales, des péricytes et des pieds astrocytaires. La N-cadhérine et la VE-cadhérine sont les deux cadhérines classiques les plus exprimées dans les cellules endothéliales. En revanche, contrairement à la VE-cadhérine qui est localisée aux JA, la N-cadhérine est davantage dispersée à la membrane apicale où elle met en place des interactions hétérotypiques avec les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) afin de stabiliser les vaisseaux sanguins (Figure 8) (Gerhardt et al., 2000).

De façon intéressante, les embryons de souris dépourvus de N-cadhérine dans le compartiment endothélial (promoteur Tie2-cre) meurent avec des défauts de la vascularisation, et notamment une altération du diamètre de la lumière des vaisseaux du sac vitellin (Luo and Radice, 2005). Similairement, l'injection d'anticorps bloquant dirigés contre la N-cadhérine dans des embryons de poulet (à E4-5) conduit aux mêmes défauts phénotypiques avec un échec du recrutement des péricytes (Gerhardt et al., 2000). Les équipes de G. Radice et E. Dejana ont fait état d'une baisse d'expression membranaire de la VE-cadhérine dans ce modèle (Giampietro et al., 2012; Luo and Radice, 2005). A l'inverse, l'extinction de l'expression de la VE-cadhérine entraîne une relocalisation de la N-cadhérine au niveau des JA (Giampietro et al., 2012). Ceci implique donc un contrôle mutuel de ces deux molécules d'adhérence cellulaire. Dans des cellules invalidées pour la VE-cadhérine et/ou la N-cadhérine, des expériences d'activation de promoteur (test luciférase) montrent que la β -caténine induit l'expression de la N-cadhérine et réprime celle de la VE-cadhérine (Giampietro et al., 2012). Ainsi, la VE-cadhérine séquestre d'une part la β -caténine, ce qui empêche l'activation transcriptionnelle du gène de la N-cadhérine, et d'autre part recrute la caténine p120 à la membrane et exclut la N-cadhérine des jonctions inter-endothéliales (Gentil-dit-Maurin et al., 2010; Giampietro et al., 2012).

III.4.ii Les jonctions gap

Au niveau du système microvasculaire, les péricytes sont accolés aux cellules endothéliales et participent à l'assemblage de la membrane basale. En revanche aux points de contact en « pince-à-linge », les péricytes interagissent directement avec la membrane des cellules endothéliales et forment des jonctions gap. Ces structures multimériques sont de véritables canaux transmembranaires constitués de deux hémi-canaux de chacun six molécules de

connexines (isoformes -43 et -40 dans la BHE), reliant le contenu cytoplasmique de deux cellules voisines (Yuan and Rigor, 2010). Les jonctions gap permettent la diffusion d'ions (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) et de petites molécules d'une taille inférieure à 1 kDa (AMP cyclique). Finalement, il semble que les connexines des jonctions gap de la BHE soient associées aux domaines PDZ des protéines ZO-1. Dans ce sens, des expériences de blocage chimique des jonctions gap (acide 18 β -glycrrhetinique) dans des cellules endothéliales de rat (RLE) réduisent la résistance transendothéliale et augmentent le flux paracellulaire au mannitol et inuline. Ensemble, ces données suggèrent que ces jonctions gap sont requises pour la fonction de barrière de la BHE.

Conjointement, les jonctions cellulaires orchestrent donc l'intégrité de l'endothélium vasculaire et la réponse plastique aux modulations de l'environnement. Une dérégulation des partenaires régissant ces jonctions est à l'origine de nombreuses pathologies, comme les cancers ou les maladies inflammatoires, caractérisées par une angiogenèse anarchique et une perméabilité vasculaire élevée.

Chapitre II. La perméabilité vasculaire tumorale

Dans le premier chapitre nous avons décrit l'organisation du réseau vasculaire et mis en lumière la spécificité des vaisseaux cérébraux. Les constituants majeurs des jonctions endothéliales ont également été présentés, ainsi que la façon dont ils pouvaient réguler la perméabilité vasculaire. Dans ce chapitre sont évoqués les mécanismes conduisant à la formation du plexus vasculaire primaire et les mécanismes d'angiogenèse lors du développement. Puis l'exposé sera orienté vers un contexte pathologique en soulignant les dérégulations des vaisseaux tumoraux induites par trois facteurs sélectionnés qui ont jalonné mon travail de thèse : le VEGF, la Sémaphorine 3A et l'IL-8.

I Formation du système vasculaire

Le processus de vascularisation est régulé selon deux principaux mécanismes : la vasculogenèse et l'angiogenèse, que nous décrivons de façon séparée en insistant sur l'implication de trois familles de molécules : VEGF, FGF et sémaphorine.

I.1 Développement de novo du système vasculaire

Avant d'accueillir le sang, qui permet à l'embryon de recevoir oxygène et nutriments, mais aussi de sécréter les déchets métaboliques dans le but de se développer, une partie de l'arbre vasculaire doit être créée. Ces vaisseaux se forment par un processus appelé vasculogenèse (Risau and Lemmon, 1988) et qui correspond à la formation *de novo* du plexus vasculaire primaire.

I.1.i Etapes de la vasculogenèse

La vasculogenèse se déroule à la fois dans les territoires extra-embryonnaires, *i.e.* la vésicule ombilicale appelée aussi sac vitellin (*yolk sac*), et au niveau du mésoderme (Jones et al., 2006), selon des mécanismes qui sont sensiblement identiques. La vésicule ombilicale est un organe éphémère permettant le transport d'aliments vers l'embryon pendant que la circulation utéro-placentaire se met en place. Chez la souris, des îlots sanguins sont identifiés dès l'âge embryonnaire E6.5-7 (Figure 12) (Patel-Hett and D'Amore, 2011) et consistent en l'agrégation d'hémangioblastes (Figure 12A) (His, 1900). Au sein de ces îlots, les cellules périphériques sont induites à se différencier en angioblastes à E8.5 (Cox and Poole, 2000), tandis que les cellules centrales donnent les cellules hématopoïétiques (Figure 12B). A E8.5,

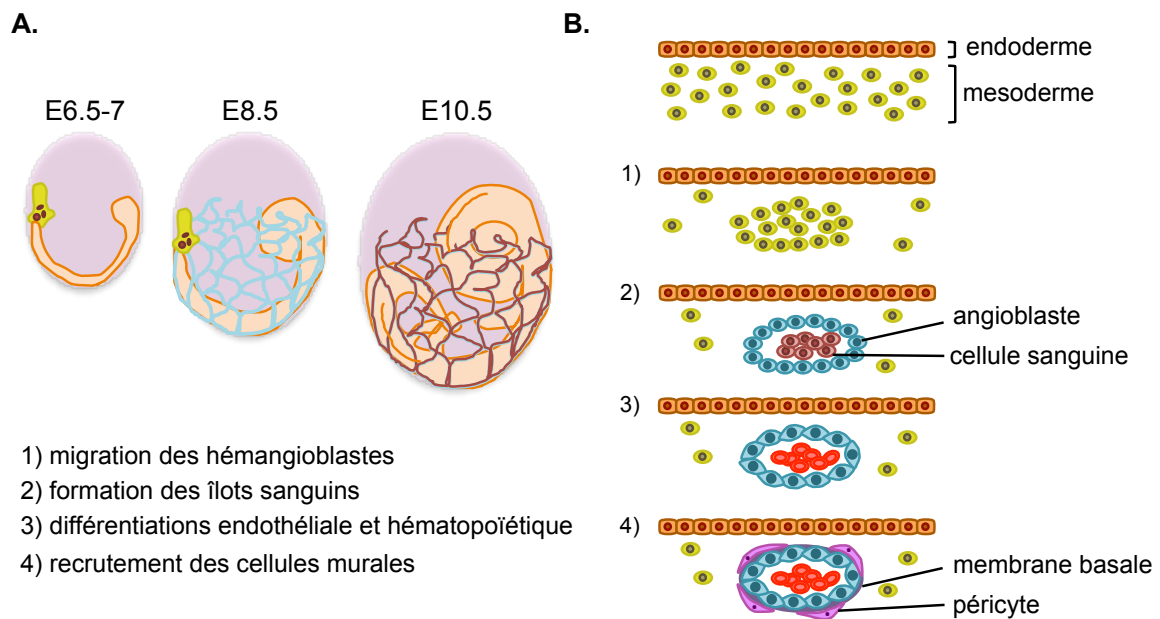


Figure 12. Grandes étapes de la vasculogenèse. **A.** Développement vasculaire embryonnaire euthérien. **B.** Schématisation de l'induction cellulaire lors de la vasculogenèse. Dès E6.5, la formation des îlots sanguins par agrégation des hémangioblastes s'effectue grâce à l'action du VEGF. Ensuite vers E8.5 le FGF-2 du mésoderme induit la différenciation des cellules périphériques des îlots sanguins en angioblastes. Finalement, après différenciation des cellules hématopoïétiques et endothéliales, la membrane basale est sécrétée et les péricytes recrutés.

les cellules endothéliales issues de la différenciation des angioblastes se réarrangent pour former des ébauches de vaisseaux, comprenant dans leur lumen les précurseurs des cellules sanguines. Au cours de cette étape, les cellules endothéliales sécrètent des protéines dans le milieu extracellulaire qui formeront la future membrane basale des vaisseaux. De la même façon, ces cellules se connectent de façon plus étroite, faisant intervenir l'établissement de JS et l'association avec les péricytes (Figure 12B). Les cellules hématopoïétiques n'envahissent la lumière des vaisseaux que plus tardivement (à E10.5).

Concomitamment à la formation du plexus vasculaire primaire dans la vésicule ombilicale, de nombreux organes de l'embryon subissent une vasculogenèse intense (foie, rein et poumon) (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993). Ces deux systèmes, extra- et intra-embryonnaire, vont finalement s'interconnecter et le plexus vasculaire se relier au cœur. De façon intéressante, il a été montré chez la souris par échographie à ultrasons que l'initiation des battements cardiaques et la circulation sanguine interviennent dans une fenêtre de temps relativement restreinte, soit 5 h entre les stades 5 et 8 somites à E8.5 (Ji et al., 2003). Ceci souligne l'importance de la parfaite orchestration de ces différents mécanismes. Par la suite, lors du processus appelé angiogenèse, les vaisseaux du plexus vasculaire forment de nombreuses ramifications afin d'irriguer au mieux toutes les parties de l'embryon. Ce mécanisme, que nous décrirons dans la partie suivante, conduit à la formation d'un arbre vasculaire stéréotypé et hautement complexifié (Burton and Jauniaux, 1995).

I.1.ii Facteurs clés de la vasculogenèse

Une coordination précise entre événements cellulaires et facteurs solubles est nécessaire afin d'obtenir l'arbre vasculaire primaire. Parmi les facteurs identifiés nous nous emploierons à en décrire trois, et ce par ordre d'implication temporelle dans les étapes de vasculogenèse.

a) Le VEGF dans les étapes précoces de la vascularisation

Des études d'invalidation génétique du VEGF et de ses récepteurs ont démontré leur rôle instrumental dans les processus de vascularisation. En effet, des embryons dépourvus de VEGFR-2 meurent prématurément (E9) et arborent un défaut d'initiation de la vasculogenèse et de l'hématopoïèse : absence d'îlots sanguins et de migration des cellules hématopoïétiques (Shalaby et al., 1995). De la même façon, la mutation d'un seul allèle du *Vegf* (Ferrara et al., 1996) ou du *Vegfr-1* (Carmeliet et al., 1996) par insertion génique conduisant à une mutation non-sens, résulte en une mort embryonnaire. L'analyse fine des embryons invalidés pour le VEGFR-1 révèle que la létalité est due à une hyper-prolifération des angioblastes, suggérant alors un rôle inhibiteur de VEGFR-1 dans la vasculogenèse (Fong et al., 1995). Le modèle actuel propose que ce récepteur agisse comme un inhibiteur par compétition avec le VEGFR-2 pour le VEGF extracellulaire. En revanche, les souris déficientes en VEGFR-3 ont une vasculogenèse et une angiogenèse normalement initiées mais des défauts cardiaques létaux à E9.5 (Patel-Hett and D'Amore, 2011). Ces problèmes apparaissent avant la mise en place du système lymphatique, pour lequel le VEGFR-3 a un rôle instrumental, de fait le rôle précis de ce récepteur dans la formation des vaisseaux reste encore inconnu.

Ainsi le VEGF et ses récepteurs, dont les modes de signalisation seront abordés dans la deuxième partie de ce chapitre, apparaissent comme des régulateurs précoces majeurs des hémangioblastes et du lignage endothélial.

b) Le FGF-2 et la macroglobuline en amont du VEGF

Nous avons précédemment vu qu'au sein des îlots sanguins, deux destins cellulaires sont possibles. Vers E8.5, le FGF-2, sécrété par les cellules du mésoderme induit la différenciation des hémangioblastes les plus périphériques en angioblastes (Figure 12B) (Cox and Poole, 2000). Une étude récente a davantage caractérisé cette induction, dont l'origine serait la protéine α_2 -macroglobuline. Cette protéine fixe et clive les sérines protéases, ce qui change alors sa conformation lui permettant de se lier et activer le récepteur LRP-1 (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein*). De façon intéressante, l'étude de cellules isolées et de corps embryonnaires de souris montre que l' α_2 -macroglobuline stimule l'expression du VEGFR-2 et du marqueur cardiaque ISL-1 (*Insulin gene enhancer protein-1*), ce qui l'impliquerait dans les processus de différenciation (Sauer et al., 2013). Dans ce sens, l' α_2 -

macroglobuline induit, via les voies PI3K et ERK, l'expression du FGF-2 qui provoque alors la différenciation des angioblastes, augmentant en retour la production endogène de VEGF. Ainsi, bien que critique pour les processus de néovascularisation, l'expression du VEGF doit être finement régulée par d'autres facteurs tels que le FGF-2.

c) La Séma3A et la neuropiline-1

Au cours du développement, la Séma3A (Séma3A) et le VEGF⁸ sont sécrétés par les cellules épithéliales de la lentille. En revanche, leur sécrétion n'est pas équivalente, puisque la production de Séma3A surpasse celle du VEGF (McKenna et al., 2014). Il faut savoir que la cornée est un des rares tissus à ne pas être vascularisé durant le développement⁹. En revanche, elle est située dans un environnement richement vascularisé entre la lentille et la cupule optique, et certains traumatismes et maladies peuvent déréguler cette exclusion de la vascularisation. Des expériences de migration ectopique d'angioblastes et d'analyse de la vascularisation ont montré que la Séma3A sécrétée par la lentille empêchent, de par son action répulsive, la migration des angioblastes au niveau de la cornée, tandis que le VEGF est un facteur qui la favorise (Figure 13) (McKenna et al., 2014). Ainsi nous pouvons d'ores et déjà identifier un premier processus pour lequel le VEGF et la Séma3A possèdent des actions antagonistes.

La neuropiline-1 (Nrp-1), un des récepteurs de la Séma3A, est également importante lors du développement vasculaire. Preuve en est donnée par l'étude de souris invalidées constitutivement pour la Nrp-1 qui, meurent à E13.5 et présentent une réduction drastique de

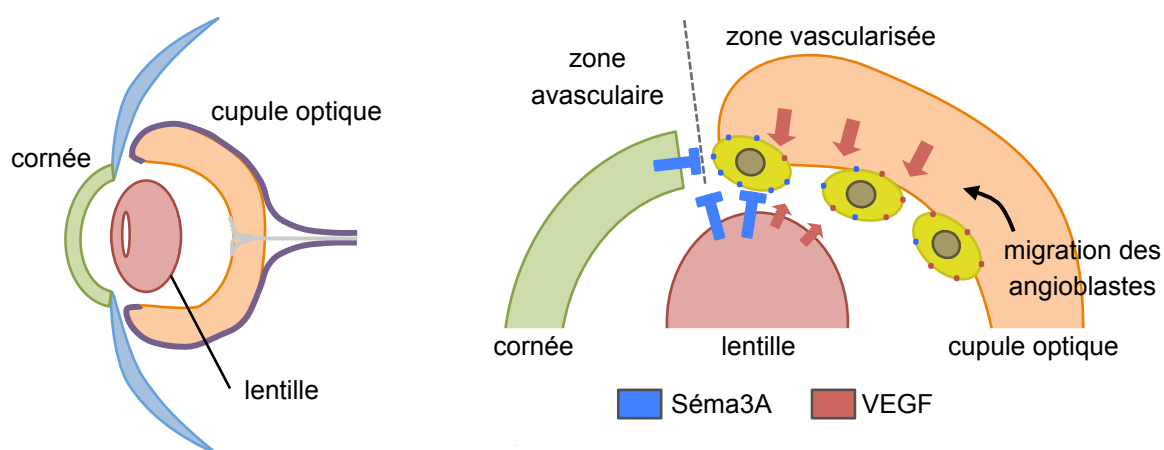


Figure 13. Implication du couple Séma3A VEGF durant la vascularisation cornéenne. Les cellules épithéliales de la lentille et de la cornée sécrètent de la Séma3A qui inhibe la migration des angioblastes initialement médiée par le gradient de VEGF. La haute concentration en Séma3A empêche ainsi la vascularisation cornéenne.

⁸ Ces deux facteurs seront décrits de façon plus poussée dans la partie II.2 de ce chapitre.

⁹ Ceci tient de sa fonction qui, en tant que lentille, doit rester transparente afin de laisser passer les rayons lumineux.

la vascularisation neurale avec des œdèmes, et un défaut d'organisation du système cardiovasculaire (Kawasaki et al., 1999). De façon intéressante, les souris chimériques surexprimant la Nrp-1 sont également non viables, avec des défauts phénotypiques de la vascularisation, du système nerveux, du cœur et des membres (digitations supplémentaires, cartilage malformé) (Kitsukawa et al., 1995). Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle développemental majeur de la Séma3A, en particulier dans le contexte cérébral où elle contribue à la formation du réseau vasculaire et neuronal.

Les facteurs que nous avons développés ne constituent pas une liste exhaustive des acteurs impliqués dans la vasculogénèse. Brièvement, des souris invalidées pour *Ihh* (*Indian Hedgehog*), TGFβ ou TGFβRII présentent des défauts de vascularisation de la vésicule vitelline et une mort embryonnaire vers E9.5-10.5 (Dickson et al., 1995; Dyer et al., 2001; Oshima et al., 1996). De même, les animaux dépourvus de Notch1 meurent vers E11 malgré un arbre vasculaire primaire normal (Krebs et al., 2000). Les défauts concernent la stabilité des vaisseaux avec une dégénérescence et un remodelage anormal. Il existe un lien entre Notch1 et VEGFR-2 lors de l'angiogénèse, processus qui sera décrit par la suite. L'ensemble de ces résultats suggère donc une compréhension encore imparfaite des mécanismes de la vasculogénèse avec, néanmoins un rôle arbitral du VEGF, FGF-2 et de la Séma3A.

I.2 Les étapes de l'angiogénèse développementale

L'angiogénèse est le processus permettant la formation de nouveaux vaisseaux, ainsi que leur ramification, à partir de ceux préexistants dans le but d'irriguer les zones non vascularisées. Ce mécanisme s'opère de deux façons, via des branchements par bourgeonnement latéral, ou bien simplement par élongation d'un vaisseau déjà formé. Chez l'adulte, la majorité des cellules endothéliales sont dans un état quiescent, et l'angiogénèse n'est normalement observée que lors de la réparation tissulaire, dans l'endomètre lors des cycles menstruels, ou enfin lors de la grossesse (Galan Moya et al., 2009). Nous nous emploierons à décrire l'angiogénèse selon quatre grandes étapes clés, ainsi que les différents facteurs et mécanismes cellulaires impliqués.

I.2.i La sélection des cellules endothéliales de front

Une balance entre les signaux pro- et anti-angiogéniques détermine le devenir des cellules endothéliales. En effet, à l'état physiologique, il est estimé que seul 0.01% des cellules endothéliales sont en prolifération cellulaire (Wenfu, 2010). Lors de l'angiogénèse, une

hypothèse prévaut et stipule qu'une seule cellule est à la base de la formation de chaque nouveau vaisseau. Deux voies de signalisation, DLL4 (*Delta-Like-4*)/Notch et VEGF/VEGFR, sont largement impliquées dans le processus de sélection de la cellule de front (*tip cell*). En effet, une concentration optimale en VEGF permet, via l'activation de son récepteur VEGFR-2, l'augmentation transcriptionnelle de Dll4. Dll4 active alors son récepteur Notch dans les cellules endothéliales directement au voisinage mais n'ayant pas reçu le signal VEGF (24). L'activation de cette voie réprime l'expression du gène *Vegfr-2* et augmente celle de *Vegfr-1* dans les cellules de soutien (*stalk cells*) (Figure 14A) (Sainson et al., 2005). A nouveau, VEGFR-1 entre en compétition avec la signalisation VEGFR-2 en capturant le VEGF (Fong et al., 1995). Ainsi par ce mécanisme, seule la cellule de front qui exprime fortement VEGFR-2 et DLL4, peut répondre aux régulations pro-angiogéniques médiées par le VEGF (Adams and Alitalo, 2007).

1.2.ii Migration et guidage cellulaire

Suite à son activation, la cellule de front effectue un bourgeonnement latéral à partir du vaisseau et subit de profonds remaniements morphologiques et fonctionnels. L'acquisition de nombreuses protrusions membranaires est la parfaite illustration de ce changement de morphologie (Figure 14B). En revanche, il a été montré par analyse des vaisseaux intersomitiques du Zebrafish, que les filopodes ne sont pas nécessaires au chimiotactisme engendré par le gradient de VEGF₁₆₅ déposé sur la matrice extracellulaire. En effet, un traitement des embryons avec la latrunculine B, composé qui désorganise les filaments d'actine, n'empêche pas la polarisation de la migration des cellules de front, mais retarde leur vitesse d'extension (Phng et al., 2013). Dans ce sens, le groupe de P. Carmeliet a montré que l'inhibition *in vivo* et *in vitro* d'une enzyme clé de la glycolyse, la PFKFB3 (*PhosphoFructoKinase-2/Fructose-2,6-Bisphosphatase*) inhibe l'angiogenèse en opérant sur la prolifération des cellules de soutien et sur la motilité des cellules de front (De Bock et al., 2013). D'autre part, les signaux favorisant la sélection positive de ces cellules (angiopoïétine, VEGF, hypoxie) induisent l'expression de la PFKFB3, alors que DLL4 l'inhibe¹⁰ (De Bock et al., 2013). De manière originale, la PFKFB3 a été retrouvée liée aux filaments d'actine au sein des protrusions des cellules endothéliales de front. Elle pourrait donc localement produire

¹⁰ Cet effet est récapitulé par le traitement de HUVEC avec le DAPT un inhibiteur de la voie Notch induisant un phénotype de cellule de front.

l'énergie sous forme d'ATP nécessaire aux remodelages membranaires et au phénotype invasif.

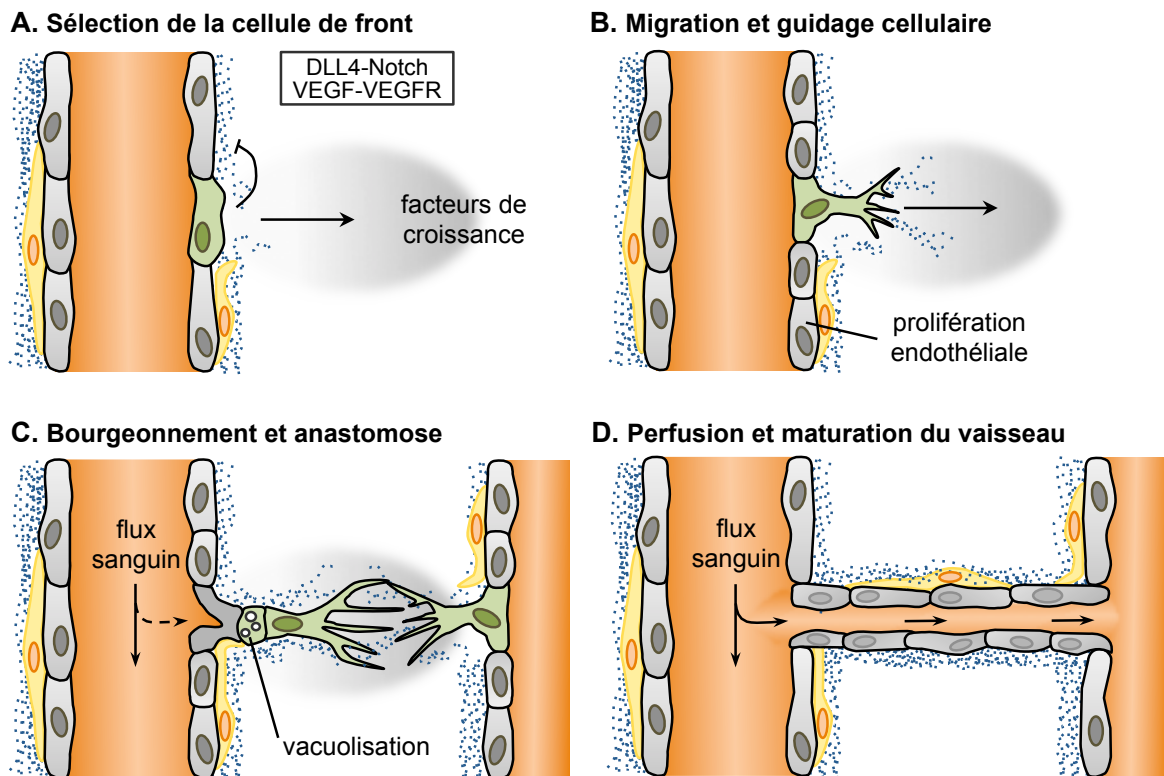


Figure 14. Les étapes de l'angiogenèse. **A.** Une concentration adéquate en VEGF permet l'expression de DLL4 dans la cellule de front, et une activation de la voie Notch dans les cellules de soutien alentours. La matrice extracellulaire est dégradée localement et les interactions péricytes-cellules endothéliales modulées. **B.** En réponse aux facteurs environnants, la cellule de front affaiblit ses jonctions endothéliales, acquiert un phénotype invasif et interagit avec la matrice extracellulaire. **C.** Les cellules de soutien prolifèrent et permettent la croissance et la rencontre de deux bourgeonnements vasculaires. Les processus de vacuolisation débutent et **D.** leur fusion conduit à la formation de la lumière et la perfusion du nouveau vaisseau. Finalement une nouvelle membrane basale est sécrétée et les péricytes stabilisent les jonctions endothéliales.

Afin d'obtenir ce phénotype migratoire, les interactions de la cellule de front avec les cellules endothéliales alentours doivent être affaiblies tout en maintenant une certaine intégrité du vaisseau. Il faut ainsi garder en mémoire que l'activation du VEGFR-2 par son ligand VEGF induit la phosphorylation de la VE-cadhérine. Ceci conduit notamment à son endocytose, promeut un affaiblissement des jonctions endothéliales, et de fait une augmentation de la perméabilité vasculaire (Gavard and Gutkind, 2006). Basé sur ce concept, l'équipe d'H. Gerhardt a récemment fait état d'un nouveau mécanisme expliquant la migration de la cellule de front. D'un côté, les taux élevés de VEGF induisent une internalisation de la VE-cadhérine et donc un phénotype migratoire, tandis que l'activation de la voie Notch inhibe les protrusions membranaires et favorise l'adhérence cellulaire (Bentley et al., 2014).

I.2.iii Bourgeonnement et anastomose

Dans un troisième temps, le bourgeonnement guidé par la cellule de front croît sous l'impulsion de la prolifération dépendante de Notch des cellules de soutien (Figure 14C) (Adams and Alitalo, 2007). Lorsque deux cellules de front sont en contact, leurs filopodes exercent une action décisive dans l'anastomose des deux bourgeons vasculaires. Ceci a été montré par microscopie intravitale chez le Zebrafish exprimant de façon constitutive un marqueur fluorescent associé aux filaments d'actine. En présence de latrunculine B, les deux cellules de front ne peuvent plus effectuer la liaison nécessaire pour former un vaisseau (Phng et al., 2013). Afin de réaliser ce processus, les deux cellules de front doivent alors modérer leur phénotype invasif et effectuer des connections stables entre elles. Ces phénomènes d'inhibition de contact, changeant ainsi leur caractère migratoire intrinsèque, restent encore obscurs mais primordiaux pour éviter notamment les shunts artério-veineux (Adams and Alitalo, 2007).

I.2.iv Perfusion et maturation du vaisseau

Finalement, la mise en place de la circulation sanguine dans ce nouveau vaisseau semble avoir lieu juste après l'anastomose des extrémités. La formation de la lumière du vaisseau est un processus qui lui non plus n'est pas entièrement élucidé. Les phénomènes de bourgeonnement et de formation de la lumière sont en effet des processus concomitants et interdépendants, et donc difficiles à étudier séparément. Actuellement, la plupart des mécanismes proposés ont été obtenus par des modèles *in vitro* de culture en trois dimension ainsi que l'étude *in vivo* des vaisseaux intersomitiques du Zebrafish (Iruela-Arispe and Davis, 2009). Plusieurs phénomènes alternatifs semblent avoir lieu de façon synergique. D'une part, la formation et la fusion de larges vacuoles au sein des cellules endothéliales génèrent la lumière du vaisseau conjointement avec la force de pression exercée par la circulation sanguine. D'autre part, les mécanismes de répulsion cellulaire et d'interaction avec la matrice extracellulaire renforcent la vacuolisation et séparent les cellules en les faisant adhérer à la matrice extracellulaire. Dans ce sens, l'invalidation de l'intégrine- $\beta 1$ dans le lignage endothélial conduit à une mort des embryons de souris entre E14.5-17.5, avec un arbre vasculaire comportant de multiples obstructions vasculaires (Zovein et al., 2010). Suite à l'activation des intégrines, les signaux *outside-in* stimulent les kinases Src et FAK, mais également des Rho GTPases, telles que Cdc42 et Rac1 impliquées dans le processus de vacuolisation (Iruela-Arispe and Davis, 2009).

In fine, la maturation du vaisseau implique le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses par un gradient de PDGF- $\beta\beta$ et de TGF- $\beta 1$, et le dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire à la surface des vaisseaux (Figure 14D) (Adams and Alitalo, 2007). Le recrutement des cellules murales intervient conjointement avec la stabilisation des jonctions endothéliales. Finalement, la signalisation angiopoïétine (Ang)-1/Tie2 permet de faire basculer les cellules endothéliales dans un état de quiescence en prévenant l'expression du VEGF ou du TNF- α , tout en stimulant leur survie via la voie AKT (Pfaff et al., 2006).

Il est à noter, qu'à n'importe quelle étape décrite précédemment, sous l'effet de changements de la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques, l'angiogenèse peut littéralement faire marche arrière et éliminer le bourgeonnement vasculaire par rétraction (*pruning*) ou apoptose. Ceci rend ainsi compte de l'incroyable degré de complexité et de plasticité de l'angiogenèse.

II Perméabilité tumorale

II.1 Angiogenèse tumorale

C'est en 1963 que les travaux de J. Folkman (Folkman et al., 1963) apportèrent la preuve que les tumeurs nécessitent une néovascularisation pour croître. En effet, lorsque des cellules de mélanome de souris sont injectées dans une thyroïde de chien cultivée de façon ectopique et perfusée par un mélange de sérum et d'hémoglobine, elles ne forment que de petites tumeurs de 1-2 mm de diamètre, dépourvues de vaisseaux sanguins. De façon intéressante, si ces tumeurs sont extraites et réimplantées dans des souris syngéniques, elles se développent alors rapidement et engendrent une tumeur vascularisée (Folkman et al., 1963). Ces travaux ont ainsi posé les bases d'un dogme stipulant que la croissance tumorale est dépendante de la perfusion par un réseau de vaisseaux sanguins dédiés.

II.1.i Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux sont caractérisés par leur perméabilité anormalement élevée et leur dilatation, ainsi qu'un profond manque d'organisation et une morphologie tortueuse. Au sein de la tumeur, la présence de nombreux shunts artério-veineux met en exergue les dérégulations angiogéniques. Ainsi, il apparaît que le flux sanguin n'est pas constant au sein d'un même vaisseau tumoral, et qu'il peut même changer de direction (Figure 15A) (Nagy et al., 2009).

Du point de vue fonctionnel, les vaisseaux tumoraux arborent typiquement une perméabilité vasculaire aux grosses molécules et protéines plasmatiques élevée. Ceci est en partie dû à un défaut de recouvrement par les péricytes et à une membrane basale discontinue. Des souris implantées avec des cellules tumorales syngéniques LLC (*Lewis Lung Carcinoma*) issues de carcinome pulmonaire, développent des tumeurs solides dont l'analyse par microscopie confocale du marqueur α -SMA (*Smooth Muscle Actin*) révèle une faible association des corps cellulaires des péricytes aux vaisseaux tumoraux (Figure 15B) (Inai et al., 2004). Dans ce sens, des xénogreffes intracrâniennes de mélanomes humains, dans des souris où l'expression de la neurogénine-2 est abolie, montre un défaut de recouvrement des péricytes sur les vaisseaux tumoraux qui deviennent alors anormalement perméables (You et al., 2014). De même, les vaisseaux tumoraux sont exempts de cellules musculaires lisses, et présentent une membrane basale pouvant être à la fois anormalement épaisse ou à l'inverse absente (Azzi et al., 2013). Ces défauts, associés aux effets du microenvironnement tumoral (facteurs pro-angiogéniques, hypoxie, inflammation etc.) sur l'architecture des jonctions endothéliales, engendrent une perte de l'intégrité de la barrière vasculaire.

Les fuites vasculaires qui en résultent provoquent une pression osmotique élevée, une hypertension interstitielle et la formation d'œdèmes vasculaires. Outre un flux sanguin chaotique, l'extravasation de molécules et donc la délivrance de drogues deviennent alors problématiques et très hétérogènes au sein de la tumeur. Des expériences de microscopie

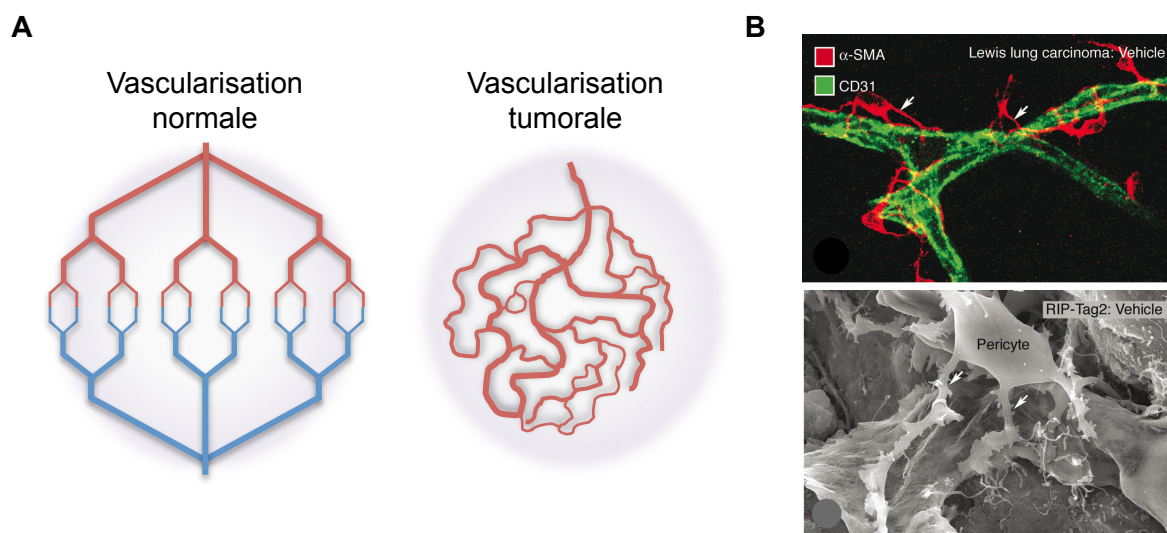


Figure 15. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux. A. Schématisation d'un réseau vasculaire normal, structuré et hiérarchisé, à opposer à une vascularisation anarchique et tortueuse dans les tumeurs. B. Organisation des péricytes dans des carcinomes pulmonaires de souris, visualisés par microscopie confocale (haut) et électronique à balayage (bas). Péricytes marqués par α -SMA (rouge) et vaisseaux par CD31 (vert). (D'après T. Inai 2004).

intravitale sur animaux vivants, portant des xénogreffes sous-cutanées de cellules squameuses de carcinome humain mettent en lumière ce phénomène. L'injection systémique de Dextran de différentes tailles couplé à un fluorochrome, indique que les molécules d'une taille de 3.3 à 10 kDa pénètrent plus profondément mais sont rapidement éliminées. A l'inverse, les molécules de 40-70 kDa, qui s'accumulent préférentiellement à la surface des vaisseaux, semblent persister dans le tissu tumoral (Dreher et al., 2006). De ce fait, l'ensemble de ces paramètres est à prendre en compte lors du *design* de nouvelles stratégies anti-cancéreuses.

II.1.ii La part des vaisseaux sanguins dans la croissance tumorale

Comme évoqué précédemment l'angiogenèse tumorale devient vite cruciale pour le développement de la tumeur. En effet, dès lors que la tumeur atteint 1-2 mm de diamètre, l'oxygène et les nutriments obtenus par simple diffusion ne sont plus suffisants à sa croissance¹¹ (Chung et al., 2010). Dans ce sens, certaines voies de signalisation pro-angiogéniques sont dérégulées et détournées. Tel est le cas des protéines HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), acteurs instrumentaux dans la réponse à l'hypoxie, et dont l'activité est contrôlée notamment par Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) dans les glioblastomes. Les xénogreffes ectopiques de lignées immortalisées gliomateuses humaines, U87 et U251, présentent une croissance tumorale réduite lorsque l'expression de Nrf2 est éteinte. Cette extinction diminue l'activation de HIF-1/2 α et donc une réduction de la production du VEGF, se traduisant alors par une vascularisation tumorale moins importante. La forte expression de Nrf2 dans des tumeurs cérébrales humaines place donc ce facteur comme une cible pharmaceutique de choix. D'autre part, HIF contribue également à la survie et à l'autorenouvellement des cellules souches tumorales¹² par activation des voies PI3K/AKT et ERK (Turpin et al., 2015). Dans ce sens, l'expression de HIF-2 α est intimement associée à la présence des CSG dans des biopsies de gliomes de haut grade, et HIF-2 α peut directement contrôler l'expression de marqueurs souches tels que OCT4 (Mazumdar et al., 2009). En outre, l'extinction stable par ARN interférent de HIF-1 α ou -2 α dans des cellules gliomateuses conduit *in vitro* à leur apoptose et à une réduction de la néoangiogenèse tumorale, ainsi qu'*in vivo* à une croissance tumorale abrogée (Li et al., 2009). Néanmoins HIF-2 α émerge de plus en plus comme un facteur crucial à l'agressivité de cancers tels le neuroblastome, et les cancers digestifs en comparaison à HIF-1 α (Zhao et al., 2015). En effet l'expression de HIF-2 α est corrélée à un mauvais pronostic dans le neuroblastome, et reste

¹¹ L'oxygène ne pouvant diffuser passivement que sur 100–200 μ m de distance.

¹² Les cellules souches cancéreuses sont présentées en détail dans le chapitre III partie II.

actif jusqu'à trois jours après induction hypoxique contrairement à son homologue HIF-1 α induisant une réponse transitoire (Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Cette famille de facteurs de transcription est également impliquée dans l'activation transcriptionnelle d'une multitude de cibles et notamment du facteur pro-angiogénique VEGF. De la même façon, tandis que HIF-2 α active l'expression de l'IL-8, cytokine pro-angiogénique, HIF-1 α effectue l'inverse (Zhao et al., 2015). Ces observations soulignent donc des rôles encore méconnus des protéines HIF, voire de potentiels effets antagonistes suivant les contextes et les cibles moléculaires.

Les processus inflammatoires sont également influents dans l'interaction entre vaisseaux et tumeur. Ceci est caractérisé notamment par l'activation des facteurs de transcription de la famille NF- κ B dans de nombreuses tumeurs conduisant à l'induction de gènes pro-inflammatoires comme certaines interleukines (IL), opérant de façon paracrine. Par exemple, Pin1 qui est fortement exprimé dans les glioblastomes peut se lier à la sous-unité p65 de NF- κ B, induire l'expression de l'IL-8 et promouvoir la migration cellulaire et l'agressivité tumorale. Cet effet est aboli lorsque l'expression de Pin1 est réduite de façon stable dans des cellules gliomateuses (Atkinson et al., 2009). Les mécanismes inflammatoires permettent également l'échappement immunitaire de la tumeur. Dans le système nerveux central l'immunité est régulée, entre autre, par les cellules de la microglie et les macrophages issues de la circulation périphérique. En condition pathologique, les macrophages représentent une part conséquente de la masse tumorale, avec environ un tiers des cellules identifiées en anatomopathologie (Conti et al., 2010). En revanche, ces cellules sont anergiques, car des facteurs tels que le TGF- β ou encore l'IL-10 empêchent l'activation subséquente des lymphocytes T, et donc la réponse immunitaire adaptative (Conti et al., 2010).

Ainsi, dans leur ensemble les phénomènes d'hypoxie et d'inflammation contribuent à une angiogenèse anormale et un échappement immunitaire permettant ainsi de soutenir survie et croissance tumorales.

II.1.iii Phénomènes métastatiques

Outre leurs rôles dans la survie et la prolifération tumorale, les vaisseaux tumoraux sont largement impliqués dans les phénomènes d'invasion et de métastase. Dans ce sens, de nombreuses études ont corrélé la faible oxygénation des tumeurs avec un risque plus important de dissémination métastatique. La mesure du taux d'oxygène peut s'effectuer chez

le rongeur grâce à des électrodes (De Jaeger et al., 2001), ou encore chez l'Homme par tomographie à émission de positrons (PET) combinée à des marqueurs hypoxiques tels que le ^{18}F -nitroimidazole (Le and Courter, 2008). La colonisation métastatique implique l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales à travers les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques ; à noter que ce mécanisme est corrélé à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Dans ce sens, la coculture entre des HUVEC et des cellules de carcinome pancréatique diminue directement la résistance électrique transendothéliale subséquente à une altération de la localisation de la VE-cadhérine et une désorganisation de l'intégrité endothéliale (Nakai et al., 2005). Dès 2004, une étude a démontré l'implication de la kinase Src dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire par déstabilisation de la VE-cadhérine (Weis et al., 2004b), l'extravasation et la dissémination métastatique après action du VEGF (Weis et al., 2004a). Plus récemment, les travaux de D. Cheresch et D. Schlaepfer ont corrélé l'implication de la kinase FAK sur le statut de la VE-cadhérine au potentiel métastatique (Jean et al., 2014). Le VEGF, sécrété notamment par les cellules tumorales, induit l'internalisation de la VE-cadhérine par phosphorylation directe par FAK sur le résidu tyrosine Y658. Lorsque des cellules cancéreuses ovariennes ou de mélanomes sont injectées par voie intraveineuse dans des souris où le gène *Ptk2* codant pour FAK est invalidé, la transmigration des cellules cancéreuses est diminuée, ce qui ultimement réduit le nombre de métastases pulmonaires (Jean et al., 2014). Ces résultats prouvent ainsi l'implication directe de FAK et suggèrent son potentiel pharmacologique multi-cible en thérapie anti-cancéreuse.

De façon moins connue, des cellules tumorales de mélanome ont été également surprises à effectuer une migration extravasculaire en utilisant, à la manière de péricyte, la membrane basale des vaisseaux sanguins ou des lymphocytes comme support (Lugassy et al., 2014). Ce processus ayant été découvert il y a quelques années, les partenaires moléculaires impliqués ne sont pas encore bien identifiés. La laminine 1, et plus particulièrement un peptide issu de la chaîne $\gamma 1$ (C16), a un rôle activateur de cette migration extravasculaire. Grâce au modèle de la membrane chorio-allantoïque de poulet (*CAM*), le profil migratoire de cellules hautement métastatiques de mélanome exprimant la GFP a été étudié. Il apparaît que les cellules cancéreuses, en présence de ce fragment C16 de laminine 1, migrent en suivant la face abluminale des vaisseaux sanguins (Lugassy et al., 2007).

II.2 Facteurs de la perméabilité tumorale

Lors de la description de la vasculogénèse et de la caractérisation des vaisseaux tumoraux, de nombreux facteurs ont été présentés. Nous décrivons ici les effets de quatre molécules sur l'endothélium vasculaire tumoral, et nous orientons l'étude, autant que la littérature le permet, dans le contexte des tumeurs du système nerveux central.

II.2.i La famille du VEGF

a) Les VEGFs, figures de proue dans l'homéostasie vasculaire

Le VEGF correspond en réalité à une famille de neuf glycoprotéines secrétées : VEGF-A à -F, EG-VEGF (*Endocrine Gland*), VEGF-b et le facteur de croissance placentaire PIGF (*Placental Growth Factor*) (Figure 16) (Patel-Hett and D'Amore, 2011). Les VEGFs appartiennent à la superfamille des gènes VEGF/PDGF possédant huit résidus cystéines conservés à la même position (Shibuya, 2001). Deux de ces résidus permettent de générer deux ponts disulfures entre deux isomères de VEGF qui agissent alors sous forme homodimérique. Les résidus restant structurent l'organisation tertiaire de chaque molécule. Le VEGF-A, le membre le mieux documenté jusqu'à présent, existe sous de multiples isoformes produites par épissage alternatif. Les exons 6 et 7 codent pour le motif de liaison au domaine de type héparine, fortement représenté dans les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines membranaires (Leung et al., 1989). L'exon 8 possède quant à lui deux sites d'épissage donnant deux isoformes à potentiel angiogénique opposé. Le VEGF-A₁₆₅ (165 acides aminés), l'une des formes les plus exprimées dans l'organisme et qui détient la plus haute affinité pour le VEGFR-2 (Keyt et al., 1996), est obtenue par épissage proximal de l'exon 8 et engendre une forme angiogénique (Bates et al., 2002). De façon intéressante, l'équipe de D. Bates a montré que l'épissage distal de cet exon produit le VEGF-A_{165b}, de taille identique au VEGF-A₁₆₅, mais dont la liaison aux HSPG et à la Nrp-1 n'est pas effective, et dont l'action est anti-angiogénique (Bates et al., 2002). De plus, dans certaines pathologies artérielles engendrant occlusions et ischémies tissulaires, le VEGF-A_{165b} a été analysé comme surexprimé, aggravant alors le phénotype (Kikuchi et al., 2014). Depuis la découverte de cette isoforme à action biologique opposée, d'autres formes VEGF_{(xxx)b} ont été caractérisées, soulignant ainsi la complexité des systèmes de régulation et la nécessité de contrebalancer les signaux pro-angiogéniques du VEGF.

b) Récepteurs et corécepteurs du VEGF

Les membres de la famille du VEGF interagissent avec trois principaux récepteurs à activité tyrosine kinase, tous membres de la famille des récepteurs au PDGF: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR et VEGFR-3/Flt-4. Ces récepteurs sont constitués d'une partie extracellulaire de sept domaines de type Ig liant le VEGF, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique contenant un domaine tyrosine kinase divisé en deux (Figure 16). La liaison du VEGF homodimérique au VEGFR engendre leur dimérisation et leur activation par autophosphorylation du domaine kinase. Au cours du développement, l'inactivation d'un de ces récepteurs (VEGFR-1, -2 ou -3) est létale entre E8.5-9.5 (Carmeliet et al., 1996; Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995).

Il est à noter que le VEGF peut également se lier aux neuropilines, des glycoprotéines transmembranaires à courte queue cytoplasmique, et qui agissent en tant que corécepteurs des VEGFR. Ces corécepteurs seront plus amplement développés dans la sous-partie suivante concernant les sémaphorines qui les utilisent également. Brièvement, l'interaction du VEGF à la Nrp-1 n'est possible que grâce à des séquences de liaison à l'héparine. Ainsi, le PlGF et différentes isoformes du VEGF (VEGF-A₁₆₅, VEGF-C, VEGF-D) peuvent s'y fixer. La liaison conjointe du VEGF à la Nrp-1 et au VEGFR-2 engendre une augmentation d'affinité de liaison du VEGF au VEGFR-2, et l'amplification de l'activation du VEGFR-2. D'autre part, une étude menée dans des cellules endothéliales primaires (HUVEC) montre que le

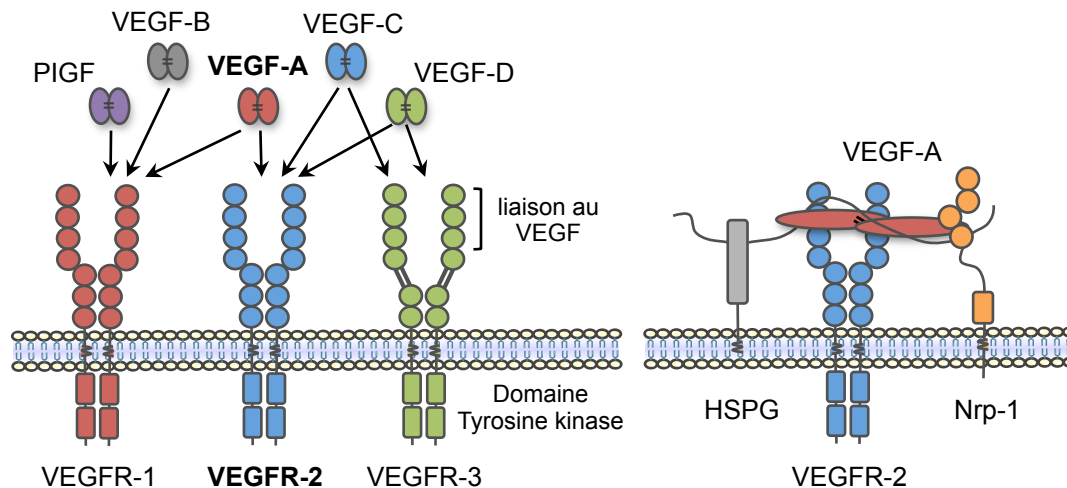


Figure 16. Interaction entre VEGF et ses récepteurs. Les VEGFs sont majoritairement représentés par le PlGF (*Placental Growth Factor*), VEGF-A, -B, -C et -D, se liant soit au VEGFR-1, -2 et -3 comme indiqué. La liaison du dimère engendre une dimérisation du VEGFR et son activation grâce à son domaine tyrosine kinase. Le VEGF peut également se lier à des corécepteurs, comme c'est le cas pour le VEGF-A se liant à la Neuropiline-1 (Nrp-1) et au HSPG (*Heparan Sulphate Proteoglycans*) par la longue chaîne de glycosaminoglycane.

VEGF₁₆₅ a une affinité 13 fois plus élevée pour la liaison à la Nrp-1 comparé à la Séma3A (Séma3A), une protéine à action anti-angiogénique, (Narazaki and Tosato, 2006). La liaison du VEGF à ce corécepteur engendre son endocytose, le rendant alors indisponible pour la Séma3A. Ainsi, la Nrp-1 peut participer à la balance des effets antagonistes du VEGF et de la Séma3A (Acevedo et al., 2008; Narazaki and Tosato, 2006).

La Nrp-2 apparaît également apte à transduire les signaux médiés par certains membres de la famille du VEGF, en particulier la Séma3F molécule anti-angiogénique et l'axe VEGF-C/VEGFR-3 crucial dans le développement lymphatique (Ellis, 2006). Bien que l'homologie de séquence à la Nrp-1 soit de 44%, l'invalidation génétique de *Nrp-2* n'engendre pas de létalité ni d'anomalies vasculaires. En revanche, durant le développement embryonnaire il apparaît des défauts dans la projection de certains nerfs crâniens (Giger et al., 2000), la formation des capillaires lymphatiques (Caunt et al., 2008; Yuan et al., 2002) et le développement de la glande mammaire (Goel et al., 2011).

Enfin, le VEGF peut se lier à un autre corécepteur nommé HSPG (*Heparan Sulphate Proteoglycans*) constitué d'une partie protéique et d'une longue chaîne de glycosaminoglycane (GAG) non branchée. Les HSPG existent sous différentes formes : soluble, associé à la matrice extracellulaire, ou bien lié à la membrane plasmique. Dans ce dernier cas, la chaîne de GAG module l'angiogenèse en affectant la disponibilité de nombreux ligands, mais aussi en faisant un pont entre Nrp-1 et VEGFR-2 favorisant ainsi leur interaction (Figure 16).

c) Signalisation pro-perméabilité induite par le VEGF

Le VEGF est une molécule dont l'expression est augmentée dans de nombreux cancers, y compris dans les tumeurs cérébrales. L'action du VEGF conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, qui sont dictées par des assemblages moléculaires ancrés aux résidus phosphorylés de VEGFR-2.

La phosphorylation du résidu tyrosine Y1175 est cruciale pour le développement vasculaire puisque des souris mutées pour ce résidu (substitution Y-A non phosphorylable) sont non viables et ont un phénotype similaire aux souris invalidées pour VEGFR-2 (Sakurai et al., 2005). Outre le déclenchement de cascade de signalisation liée à la prolifération cellulaire, ce résidu est couplé à l'activation de eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) (Figure 16). Différentes études ont en effet mis en lumière le rôle de eNOS dans des pathologies inflammatoires (Argaw et al., 2012), ou tumorales du système nerveux central (Bulnes et al., 2010). De manière intéressante, l'injection d'une matrice de collagène mélangée au VEGF sur

les méninges de souris invalidées pour eNOS n'induit pas d'augmentation de perméabilité vasculaire (mesurée par l'extravasation d'albumine couplée à un fluorochrome) (Fukumura et al., 2001). En outre, les vaisseaux tumoraux au sein des gliomes de haut grade surexpriment eNOS, pouvant favoriser la rupture de la BHE et la formation d'œdème (Bulnes et al., 2010). Subséquemment à cette rupture de l'endothélium, des érythrocytes se retrouvent dans le tissu cérébral et peuvent exacerber le phénotype par sécrétion d'hémoglobine. En effet, l'injection stéréotaxique d'une solution d'hémoglobine chez le rat entraîne une forte induction d'expression d'eNOS, et à l'inverse une inhibition de l'expression de protéines des JS, telles que claudine-5, ZO-1 ou JAM-1 (Yang et al., 2013).

La phosphorylation du résidu tyrosine Y951 permet quant à elle l'interaction du complexe adaptateur VRAP (*VEGF Receptor-Associated Protein*) et le recrutement de la kinase Src. Cette kinase est instrumentale dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire après stimulation au VEGF. En effet, la perméabilité des vaisseaux épidermiques (*Miles assay*) et cérébraux (injection stéréotaxique) normalement induite par le VEGF est abolie dans les souris invalidées pour Src (Eliceiri et al., 1999). Src agit directement sur le complexe adhésif VE-cadhérine/caténines par phosphorylation sur tyrosine et déstabilisation des jonctions (Weis et al., 2004a), et indirectement au travers de la voie Vav2/Rac/PAK, et la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le résidu sérine S665. Cet ajout de phosphate promeut alors le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation de la VE-cadhérine associée à une désorganisation des jonctions endothéliales (Gavard and Gutkind, 2006). D'autre part, des résultats récents mettent en lumière une corrélation entre les kinases FAK et Src. En effet, après stimulation par le VEGF de cellules pulmonaires de souris HPAEC, FAK et Src sont recrutées de concert au niveau des JA. Ce recrutement est notamment perdu lorsque des inhibiteurs chimiques de FAK ou Src sont employés. En outre, l'utilisation du Dasatinib, un inhibiteur pharmacologique de Src ciblant le site de fixation à ATP, abroge la phosphorylation du résidu tyrosine Y658 de la VE-cadhérine, une cible directe de FAK (Jean et al., 2014). Ces expériences suggèrent donc que FAK agit en aval de Src en réponse au VEGF, et qu'ensemble FAK et Src ciblent les résidus tyrosine Y658 et Y685 de la VE-cadhérine impliqués dans son internalisation.

La kinase Src, caractérisée dans les processus de perméabilité vasculaire induite par le VEGF, est actuellement en cours d'investigation dans le cadre d'essai clinique pour son action anti-tumorale. Le Bévacicumab, dont il sera question dans le chapitre 3, permet de cibler le VEGF mais son efficacité dans les gliomes reste minime. Actuellement d'autres approches tendent à

inhiber la signalisation induite par le VEGF. Notamment, l'équipe de S. Germain a montré que l'ANGPTL4 (*Angiopoietin-like 4*), dans un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale, permet d'inhiber la perméabilité vasculaire induite par le VEGF de façon dépendante de Src (Bouletti et al., 2013). Cette nouvelle perspective de traitement pourrait, par exemple, être appliquée pour des patients atteints de gliomes dans l'optique de soulager l'œdème vasculaire péri-tumoral.

II.2.ii La Sémaphorine 3A

a) Les sémaphorines

Ces molécules, découvertes en 1993 dans l'embryon de poulet, ont initialement été désignées sous le nom de collapsine de par leur action désorganisatrice des cônes de croissance neuronaux (Luo et al., 1993). Elles ont par la suite été rebaptisées sémaphorines (1999), en allusion aux sémaphores maritimes et ferroviaires qui permettent d'orchestrer les transports. Dans ce sens, les sémaphorines représentent une des plus grandes familles de molécules impliquées dans le guidage cellulaire, participant ainsi au remodelage morphologique et à diverses fonctions physio-pathologiques (Sakurai et al., 2012).

Cette famille de gènes regroupe 20 sémaphorines réparties selon les classes I à II pour les invertébrés (Séma5c comprise), et de III à VII pour les vertébrés que nous décrirons plus particulièrement (1999). Une forme virale (poxvirus et virus de l'herpès) de la sémaphorine qui se rapproche de la forme sécrétée de la Séma7A a récemment été impliquée dans les processus d'inhibition de la phagocytose par les cellules dendritiques (Myster et al., 2015). Chez les vertébrés, la classe III regroupe les sémaphorines sécrétées, tandis que les classes IV-VI correspondent à des protéines transmembranaires ; la classe VII possède une ancre GPI (*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*) lui conférant une attache à la membrane plasmique (Figure 17). Du point de vue structural, chaque sémaphorine possède un domaine extracellulaire N-terminal Sema, caractéristique de cette famille. Pour les Séma3A, -4D, -6A et -7A, ce domaine Sema est essentiel à leur dimérisation et leur liaison subséquente aux neuropilines et plexines (Janssen et al., 2012). Le domaine PSI (Plexine-Sémaphorine-Intégrine) est également présent chez tous les membres de cette famille, excepté la sémaphorine virale (Figure 17), et permet l'interaction ligand-récepteurs. Enfin, des sites de clivages enzymatiques par les furines, membre la famille des PPC (*Pro-Protein Convertase*) ont été identifiés sur les sémaphorines de classe III, IV et VI. Cette action permet de moduler, voire de contrecarrer l'action des sémaphorines, en particulier pour les sémaphorines de classe III (Guo et al., 2013; Mumblat et al., 2015; Varshavsky et al., 2008). Ces sémaphorines peuvent

être clivées trois fois : un site unique en N-terminal générant un fragment de 60 kDa, et deux sites en partie C-terminale.

Une étude basée sur l'étude du potentiel répulsif de ces fragments sur les cônes de croissance des neurones, révèle que le fragment de 60 kDa serait inactif, mais que les

deux autres clivages en C-terminal potentialiseraient l'effet répulsif des sémaphorines de classe III (Adams et al., 1997).

b) Plexines, neuropilines et Sémaphorine 3A

Plexines et neuropilines sont toutes deux des récepteurs potentiels des sémaphorines. Les neuropilines sont au nombre de deux chez les vertébrés : Nrp-1 et -2 (Sakurai et al., 2012). Ce sont des corécepteurs pour divers ligands tels que certaines sémaphorines, VEGF, FGF, PlGF-2 et d'autres protéines liant l'héparine. Ceci explique donc pourquoi les souris invalidées pour la Nrp-1 meurent à l'état embryonnaire et exhibent des défauts sévères des systèmes vasculaires et nerveux (Kawasaki et al., 1999). Les neuropilines sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité extracellulaire contient cinq zones distinctes nommées a1, a2, b1, b2 et c1 en partant de la partie C-terminale (Figure 17). Dans le même ordre, ces régions représentent deux domaines CUB (*Complement-C1r/C1s Uegf Bmp1*), deux domaines FV/FVIII (*coagulation factor-like*) et un domaine MAM (*Meprin/A5-protein/PTP*) juxtamembranaire. Par des études de mutants arborant diverses délétions, il a été montré que les deux premiers domaines CUB, a1 et a2, sont indispensables à la liaison du dimère de sémaphorine à la neuropiline (He and Tessier-Lavigne, 1997). De même, le domaine MAM de Nrp-1 est requis pour sa dimérisation et la signalisation par la Séma3A (Nakamura et al., 1998). A l'exception de la Séma3E qui se lie directement à la Plexine-D1 (Gu et al., 2005),

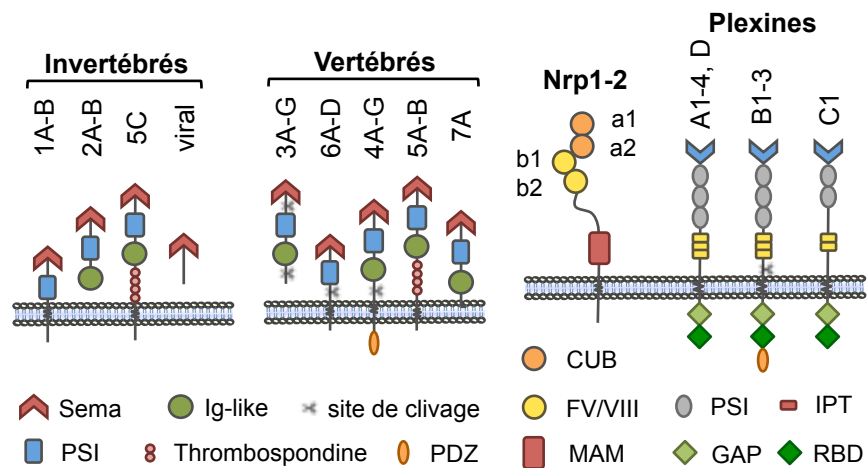


Figure 17. Les sémaphorines et leurs récepteurs. Les sémaphorines peuvent être solubles ou membranaires et se fixent en dimère aux neuropilines (Nrp) par les domaines CUB (*Complement-C1r/C1s Uegf Bmp1*), et aux plexines via le domaine Sema. Les deux domaines FV/FVIII (*coagulation factor-like*) des Nrp fixent le dimère de VEGF, et le domaine MAM (*Meprin/A5-protein/PTP*) est requis pour sa dimérisation. Sur les plexines, le domaine RBD (*RhoGTPase Binding Domain*) lie les Rho-GTPases ce qui permet l'activation du domaine GAP (*GTPase activating protein*) et l'inhibition subséquente de R-, M-Ras.

les Séma -3B, -3C et -3F nécessitent la Nrp-2, tandis que la Séma3A interagit avec la Nrp-1 (Takahashi and Strittmatter, 2001). Les neuropilines apparaissent alors comme des adaptateurs dans le but d'activer une signalisation dépendante de la liaison du ligand et d'autres récepteurs en complexe (i.e. plexines, VEGFR). En effet, la queue cytoplasmique des neuropilines est relativement courte, une trentaine de résidus seulement, et ne serait donc pas apte à transduire un signal par elle-même (Sakurai et al., 2012).

Les plexines ont initialement été découvertes par des études chez le Xénope où le rôle d'organisation des neurones olfactifs leur fût attribué. Depuis, deux plexines ont été caractérisées chez les invertébrés (Plxn-A et -B), et neuf chez les mammifères, organisées en quatre classes (A1-4, B1-3, C1 et D1) (Sakurai et al., 2012). Contrairement aux sémaphorines qui arborent différentes structures, l'organisation générale des plexines est relativement conservée avec un domaine extracellulaire Sema, un domaine unique transmembranaire et une partie intracellulaire avec un domaine GAP (*GTPase activating protein*), RBD (*RhoGTPase Binding Domain*) et parfois PDZ. Le domaine RBD lie des Rho GTPases, uniquement sous leur forme active, telles que Rnd1, Rac1 et RhoD qui modulent le cytosquelette d'actine. Les GTPases liées au domaine RBD, ajoutée à la liaison simultanée de la sémaphorine, permet une agrégation des plexines nécessaires à l'activation du domaine GAP et l'inhibition subséquente de R-Ras et M-Ras (Bell et al., 2011). Le domaine PDZ peut également lier des protéines telles que des Rho-GEF. L'activation des Rho-GEF permet via la voie RhoA/ROCK l'activation *inside-out* des intégrines, engendrant un assemblage des adhésions focales, une activation de Pyk2 et Src, et promeut en retour un signal pro-angiogénique dans les cellules endothéliales (Basile et al., 2005). En revanche, l'inactivation de R-Ras a un effet inverse sur les intégrines et est anti-angiogénique (Sakurai et al., 2012). Dans ce sens, la Séma3A peut s'associer aux Plxn-A1, -A2 ou -A4 (Takahashi and Strittmatter, 2001; Yaron et al., 2005) selon les contextes cellulaires afin de transduire une signalisation spécifique. Par exemple, la Séma3A induit, via la Plxn-A1, une rétraction des cellules endothéliales cérébrales organisées en monocouche mimant la BHE (Le Guelte et al., 2012).

Les mécanismes d'interactions entre neuropilines, plexines et sémaphorines ne sont pas encore entièrement compris. Récemment, une étude a permis la modélisation des interactions séquentielles du complexe Séma3A/Plxn-A2/Nrp-1. Il semble que Nrp-1 et Plxn-A2 peuvent former des complexes *cis* de façon indépendante de la Séma3A. En revanche, la liaison de l'homodimère Séma3A à la neuropiline et à la plexine, permet de stabiliser ce complexe trimérique et de recruter une deuxième molécule de Plxn-A2. Ultimement ceci engendre le recrutement d'une deuxième molécule de Nrp-1, qui entraîne, via son domaine MAM,

l'agrégation avec d'autres complexes Séma3A/Plxn-A2/Nrp-1 et l'activation de la signalisation intracellulaire (Janssen et al., 2012).

c) La Séma3A dans le système vasculaire

La Sémaphorine 3A est une protéine dont l'expression est dérégulée dans de nombreuses pathologies affectant l'œil, mais également dans les cancers du sein, poumon, pancréas, colon, rein et cerveau (Catalano et al., 2006). Récemment, il a été montré dans un contexte de carcinome pulmonaire de Lewis, que la Séma3A est surexprimée et sécrétée par les cellules tumorales dans un contexte hypoxique (Casazza et al., 2013). La Séma3A agit alors comme chimio-attractant et favorise l'entrée des macrophages dans la tumeur. Ces macrophages, dont l'expression dans la tumeur peut être synonyme de progression tumorale, expriment la Nrp-1 qui transduit le signal médié par la Séma3A jusqu'au VEGFR-1 via les plexines. En effet, l'extinction *in vitro* des Plxn-A1 et -A4 dans les macrophages, empêche la phosphorylation de VEGFR-1 après stimulation par la Séma3A (Casazza et al., 2013). Ainsi l'expression de la Séma3A semble être un facteur pro-tumoral en attirant les macrophages associés à la tumeur dont leur rôle peut être pro-angiogénique et immunosuppresseur. Concernant sa modulation de la réponse immunitaire, une étude basée sur l'utilisation de milieux conditionnés provenant de cellules tumorales, ou de clones de cellules COS-7 exprimant la Séma3A à différents niveaux et la sécrétant donc à différentes concentrations, a permis de dévoiler comment ce facteur est également impliqué dans la régulation des lymphocytes T. Il apparaît ainsi que la Séma3A agit en activant Rap1, une petite protéine G qui inhibe la voie Ras/MAPK, et ainsi bloque les lymphocytes T en quiescence. D'autre part, Rap1 empêche également l'activation transcriptionnelle de l'IL-2, un facteur crucial pour la différenciation des lymphocytes en LT_H et mémoire (Catalano et al., 2006). Ensemble, de par son action sur les macrophages et les lymphocytes, la Séma3A semble avoir un rôle pro-tumoral en favorisant l'échappement immunitaire.

Dans le contexte tumoral de glioblastome, la Séma3A est également décrite comme ayant un rôle sur la vascularisation tumorale. Il apparaît qu'au sein de la tumeur, la Séma3A est majoritairement exprimée par les cellules à caractère souche gliomateuses, population responsable de l'initiation et de l'agressivité de ces tumeurs (développé dans le chapitre III partie II). En effet, des cellules primaires initiatrices, isolées de résection chirurgicale présentent des taux plus haut de Séma3A que les cellules cancéreuses différenciées (U87) (Le Guelte et al., 2012). Au sein du microenvironnement tumoral, la Séma3A agit alors sur les cellules endothéliales et promeut une augmentation de la perméabilité vasculaire. Par des

modèles de coculture avec des cellules endothéliales humaines récapitulant la BHE (hCMEC/D3) et des extinctions par ARN interférent, notre laboratoire a montré que la Séma3A agit via le couple Nrp-1/Plxn-A1 porté par les cellules endothéliales. Ce complexe active la kinase Src qui inhibe PP2A et favorise son inactivation subséquente via Set (Le Guelte et al., 2012). PP2A est une phosphatase qui sécurise les jonctions endothéliales matures en liant la VE-cadhérine, et en empêchant sa phosphorylation sur le résidu sérine S665 responsable de son internalisation (Gavard and Gutkind, 2006). Ainsi, la Séma3A sécrétée par les cellules souches gliomateuses promeut une hausse de la perméabilité vasculaire. Une autre étude portant sur les cellules endothéliales HUVEC a montré, quant à elle, que la Séma3A induit une augmentation de perméabilité vasculaire de manière indépendante de Src, qui peut être entravée par un inhibiteur de la PI3K γ/δ . Enfin, une étude modélisant la rétinopathie diabétique montre que la Séma3A, sécrétée par les neurones rétiniens, induit la voie Src/FAK dans les cellules endothéliales rétiniennes (hRMEC) et *in vivo*. Ce mécanisme dépendant de Nrp-1 déclenche la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le résidu tyrosine Y731 et son internalisation, déstabilisant ainsi la barrière rétinienne (Cerani et al., 2013). Ceci suggère donc la possibilité de voie de signalisation divergente selon les modèles de cellules endothéliales (HUVEC *versus* BHE ou BRE). Néanmoins, ces travaux démontrent le rôle néfaste de la Séma3A sur l'intégrité vasculaire dans un contexte pathologique ; et les modes d'action de la Séma3A font l'objet d'une partie de mes travaux de thèse.

II.2.iii L'interleukine 8

Les interleukines (IL) forment un large groupe de 55 membres répartis en différentes familles, dont celles des cytokines à motif structural CXC. Au sein de cette famille, certaines cytokines possèdent un motif ELR telles les protéines GRO (*Growth-related genes*), l'IL-8 et l'ENA-78 (*Epithelial Neutrophil Activating-protein 78*). Par étude de mutant IL-8 dénué du motif ELR il a été montré que cette séquence est cruciale quand au caractère pro-angiogénique de l'IL-8 (Strieter et al., 1995). Ainsi, les cytokines à motif structural CXC et possédant le motif ELR sont décrites comme de puissants inducteurs pro-angiogéniques, à l'inverse de celles qui en sont dépourvues et induites par l'interféron également un facteur anti-angiogénique (Belperio et al., 2000). L'IL-8 est une molécule chimiotactique puissante des neutrophiles et lymphocytes, qui exerce un effet de type inflammatoire et pro-angiogénique sur les cellules endothéliales. Dans ce sens, le traitement de cellules endothéliales de cordon ombilical (HUVEC) et de cellules endothéliales cérébrales (hCMEC:D3) par l'IL-8 déclenche

l'internalisation de la VE-cadhérine dépendante de sa phosphorylation sur le résidu sérine S665 (Dwyer et al., 2012; Gavard et al., 2009). Une approche pharmacologique a permis de mettre en évidence l'implication d'une voie différente, bien que convergente, de celle décrite pour le VEGFR-2, qui fait intervenir le récepteur à l'IL-8 (CXCR2) et la cascade de signalisation PI3K γ -Rac-PAK (Gavard and Gutkind, 2006; Gavard et al., 2009). Il est en effet intéressant de constater que, contrairement au VEGF et à la Séma3A, la modulation de la perméabilité vasculaire par l'IL-8 ne passerait pas par Src. Ce mécanisme a été vérifié par plusieurs modèles *in vivo* dont le modèle original de brûlure par laser de la membrane choroïdienne de l'œil qui stimule alors la revascularisation de la zone touchée. De façon intéressante, l'inhibition de la PI3K γ récapitule les effets observés avec les inhibitions séparées du VEGFR-2 ou du CXCR2 (Gavard et al., 2009). Ceci suggère donc que les cascades de signalisation activées par l'IL-8 pourraient être au moins aussi efficaces que le blocage du VEGF pour abroger la néovascularisation. Par ailleurs, l'expression de l'IL-8 et du VEGF semble liée. Une étude dans une lignée de cellules endothéliales (SVEC) montre que l'IL-8 peut induire l'expression du VEGF de façon indépendante de HIF-1 (Martin et al., 2009). D'autre part, la surexpression du gène de l'IL-8 est corrélée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de glioblastome (Dwyer et al., 2012). Dans ce sens, notre laboratoire a montré que des concentrations élevées d'IL-8 sont présentes dans le sécrétome de cellules cancéreuses du glioblastome (U87), tandis que cette cytokine est requise pour la hausse de la perméabilité dans des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. En effet, le traitement du milieu conditionné des cellules gliomateuses avec un anticorps bloquant l'IL-8 abroge l'effet pro-perméabilité de l'IL-8 (Dwyer et al., 2012).

Nous avons vu que de nombreuses molécules sécrétées, telles que le VEGF et l'IL-8 ont des effets pro-angiogéniques et pro-tumoraux avérés. D'autres telle que la Séma3A en revanche, semblent avoir, selon le contexte, des effets controversés sur la progression tumorale. Dans le cas du glioblastome, ce facteur sécrété au sein de la niche vasculaire tumorale, et auquel je me suis intéressé au cours de mon doctorat, pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante.

Chapitre III. Communication entre cellules endothéliales et cellules souches initiatrices du glioblastome

Dans le deuxième chapitre nous avons exposé les événements moléculaires impliqués dans l'angiogenèse normale et pu comparer le rôle de certains acteurs dans un contexte tumoral. Ainsi, les actions du VEGF et de la Séma3A ont été mises en lumière au cours de l'établissement du réseau vasculaire tumoral. Dans ce chapitre sont d'abord présentées les tumeurs du système nerveux central, puis le rôle crucial des cellules cancéreuses à caractère souche dans les gliomes de haut grade. Enfin, l'implication du microenvironnement tumoral est développée au travers du rôle émergent des vésicules extracellulaires dans la biologie tumorale, médiateurs auxquels je me suis particulièrement intéressé durant mes travaux de thèse.

I. Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales malignes sont parmi les cancers les plus agressifs, avec un pronostic sombre aggravé par des répercussions directes, souvent lourdes, sur la qualité de vie du patient. Selon l'Institut National du Cancer (INCa), 5000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France en 2012. Parmi ces tumeurs, 82% des gliomes malins sont des glioblastomes (GBM) dont la survie après traitement se situe entre 15 et 18 mois (Yan et al., 2013). De ce fait, le GBM rend ainsi compte de la quasi totalité des décès liés aux tumeurs du système nerveux central.

I.1 L'hétérogénéité des gliomes

I.1.i Classification et grade

D'après le dernier traité de l'organisation mondiale de la santé, les gliomes se répartissent selon quatre grades histologiques (Louis et al., 2007). Les grades I et II correspondent à des tumeurs non invasives et faiblement prolifératives, traitées par résection chirurgicale seule. L'histologie tumorale révèle un tissu semblable au tissu sain du point de vue du statut de différenciation, mais présente toutefois une densité cellulaire plus élevée. La caractérisation génomique des tumeurs indique des anomalies génétiques apparentes telles que des mutations de *IDH1/2*, et *TP53* (Suzuki et al., 2015). Parmi les tumeurs de grade II, peuvent être mentionnés les astrocytomes de faible grade, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes. Malgré leurs faibles capacités prolifératives, des altérations génétiques peuvent les faire

évoluer vers un phénotype invasif de grade III, qualifié alors d'anaplasique (i.e. astrocytome anaplasique) (Suzuki et al., 2015). Au sein du grade III, l'histologie tumorale révèle des noyaux morphologiquement atypiques, un fort index mitotique et une vascularisation importante. Enfin, les tumeurs de grade IV arborent les mêmes caractéristiques morphologiques que le grade III ainsi qu'un cœur nécrotique et un large œdème péritumoral (Louis et al., 2007). Parmi les néoplasmes de grade IV peuvent être mentionnés les GBM, qui sont les plus fréquents et dont nous parlerons plus particulièrement, ainsi que les médulloblastomes et les tumeurs rhabdoïdes chez l'embryon. A noter que 90% des GBM apparaissent *de novo*, avec un pic d'incidence après 60 ans, contrairement aux GBM secondaires qui dérivent d'astrocytomes de bas grade et dont la lésion primaire intervient plus fréquemment entre 20 et 40 ans (Westphal and Lamszus, 2011).

1.1.ii Sous-types moléculaires des glioblastomes

L'analyse des profils transcriptomiques tumoraux des GBM révèle quatre sous-types majeurs selon leurs signatures moléculaires, regroupées sous la classification de Verhaak : classique, mésenchymal, neural et proneural (Verhaak et al., 2010). En recoupant les profils de mutations génétiques et la réponse thérapeutique des patients, le sous-type proneural a été récemment divisé en deux selon le profil de méthylation d'îlots CpG des tumeurs (Nakano, 2015). De plus, les analyses transcriptomiques à grande échelle ont permis de caractériser plusieurs mutations récurrentes utilisées lors du diagnostic (Tableau 1) (Nakano, 2015). Ainsi, les mutations des gènes *IDH1*, *TP53* et *EGFRvIII* sont recherchées afin d'orienter le

Tableau 1. Classification par sous-type des gliomes de haut grade

Sous-type	CIMP+ PN	CIMP- PN	MES	Classical	Neural
Fréquence	10%	12%	30%	35%	12%
Age moyen	44.5	50.6	53.4	57.7	63.8
Pronostic	relativement bénin	modéré	mauvais	mauvais	mauvais
Réponse au traitement	non résistant	non résistant	résistant	résistant	résistant
Signature génétique	Distincte	Mutuellement exclusive		Recoupement avec PN et MES	
Méthylation	globale	faible	faible	faible	faible
Mutation récurrente	<i>IDH1</i> , <i>TP53</i> , <i>ATRX</i>	<i>PGDFRA</i> <i>ampli.</i> , <i>TP53</i> , <i>CDKN2A</i> <i>délété</i> , <i>CDK4</i>	<i>NF1</i>	<i>EGFR</i> ampli. ou muté (vIII), <i>CDKN2A</i> <i>délété</i>	variable

PN: proneural; MES: mesenchymal; CIMP: méthylation des îlots CpG; ampli.:amplification génique.

diagnostic (Westphal and Lamszus, 2011). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le sous-type mésenchymal est de plus mauvais pronostic comparé au proneural en terme d'invasion, de densité vasculaire et de résistance au traitement (Gilbertson and Gutmann, 2007). En outre, les gliomes de type mésenchymal dérivent principalement de tumeur primaire et en particulier de GBM, alors que les sous-types proneuraux peuvent être initialement des gliomes de grade III. A terme, l'ensemble de ces mutations pourrait permettre la mise en place de thérapies personnalisées dépendamment non seulement du grade, mais aussi du sous-groupe impliqué et des mutations associées.

1.2 Aspects cliniques du glioblastome

1.2.i Une première ligne de traitement peu efficace

L'aspect majeur du traitement est la résection chirurgicale de la tumeur. Lorsque celle-ci est circonscrite et opérable, l'exérèse permet une réduction de la masse tumorale et donc de l'hypertension crânienne. Cet acte peut-être associé à une récupération, au moins partielle, des fonctions cognitives lésées ; cependant les tumeurs du système nerveux central pénètrent souvent largement le tissu cérébral, rendant ainsi la résection risquée. Enfin, il est à noter que contrairement aux autres tumeurs, les gliomes restent localisés au cerveau avec une diffusion systémique vers la moelle épinière qui reste anecdotique (seulement 2% des GBM). Suite à la chirurgie, la première ligne de traitement préconisée consiste en une radiothérapie de 60 Gy, divisée en 30 fractions, combinée à une chimiothérapie orale au Temozolomide (TMZ). Le TMZ est un agent alkylant permettant de transférer un groupement méthyl aux bases pyrimidiques de l'ADN et former un O⁶-methylguanine. Cette marque est ensuite reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN et promeut un arrêt du cycle cellulaire, comme analysé dans des lignées gliomateuses U373-MG et T98G. En revanche, le TMZ n'est que peu efficace car les cellules présentent des mutations des voies de réparation supprimant cet adduit (Nanegrungsunk et al., 2015). Ce traitement est appuyé par un essai clinique de phase 3 qui démontre une augmentation de la survie médiane de 14.6 mois comparée à 12.1 mois sous radiothérapie seule (Stupp et al., 2005). Ce protocole de référence, dit de Stupp, est largement appliqué en première ligne et le seul approuvé par les agences de régulation. Néanmoins, il existe d'autres traitements, tels que l'implantation de Carmustine dans le lit tumoral après résection, ou encore les traitements par Ifosfamide, Carboplatine et Etoposide mais dont la balance bénéfice-risque reste encore largement inconnue.

I.2.ii Une récurrence largement inévitable

La rechute est associée à une résistance au traitement suivie d'une résurgence tumorale. Le Bevacizumab, développé par Genentech et commercialisé sous le nom d'Avastin, est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF et approuvé depuis 2009 par la FDA (*Food Drug Administration*) (Cohen et al., 2009). Son utilisation en protocole expérimental est également répandue en Europe, et il agit en prévenant l'action pro-angiogénique et prolifératif du VEGF sur son récepteur VEGFR-2. Le laboratoire de J. Rich a montré *in vitro* que le Bevacizumab a un rôle anti-angiogénique et anti-migratoire sur des cellules endothéliales HUVEC (Bao et al., 2006b). Ce traitement permet également de réduire la croissance tumorale de xénogreffes ectopiques (Bao et al., 2006b) et orthotopiques (Calabrese et al., 2007) de cellules souches gliomateuses chez la souris ¹³.

Toutefois, plusieurs études récemment parues dans *The New England Journal of Medicine* remettent en question l'utilisation du Bevacizumab en tant que traitement des gliomes récurrents. En effet, que ce soit par traitement seul avec la radiothérapie (Gilbert et al., 2014) ou associé avec le TMZ plus la radiothérapie (Chinot et al., 2014), la survie globale des patients enrôlés n'est pas améliorée tandis que leur qualité de vie s'en voit même détériorée ! Un effet positif de la « trithérapie » demeure pourtant puisque la survie sans progression augmente de 6.2 à 10.6 mois (Chinot et al., 2014). Il faut de fait souligner l'agressivité du GBM et la récurrence touchant virtuellement tous les patients, 7 à 10 mois après la première ligne de traitement.

I.2.iii Les causes de la récurrence

De nombreuses hypothèses tendent à expliquer l'échec du traitement au Bevacizumab (Figure 18). Tout d'abord, l'analyse anatomopathologique des tumeurs de patients récurrents indique un changement du phénotype proneural vers mésenchymal, dont le pronostic est le moins favorable (Piao et al., 2013; Soda et al., 2013). L'équipe de J. de Groot a mis en lumière que le traitement par un anti-VEGF, de xénogreffes orthotopiques de U87 résistantes au Bevacizumab, augmente l'expression de facteurs oncogéniques associés à la signature mésenchymale : TGF- β , STAT3, c-MET (Piao et al., 2013; Soda et al., 2013). En outre, l'étude transcriptomique des cellules tumorales issues de ces xénogreffes révèle une activation anormale des voies de réponse inflammatoire et de modulation des cellules immunitaires (Piao et al., 2013). Dans ce sens, il a été observé que de nombreuses cellules myéloïdes sont recrutées à la périphérie tumorale après traitement au Bevacizumab, et que

¹³ Cellules souches cancéreuses décrites dans ce chapitre, partie II.

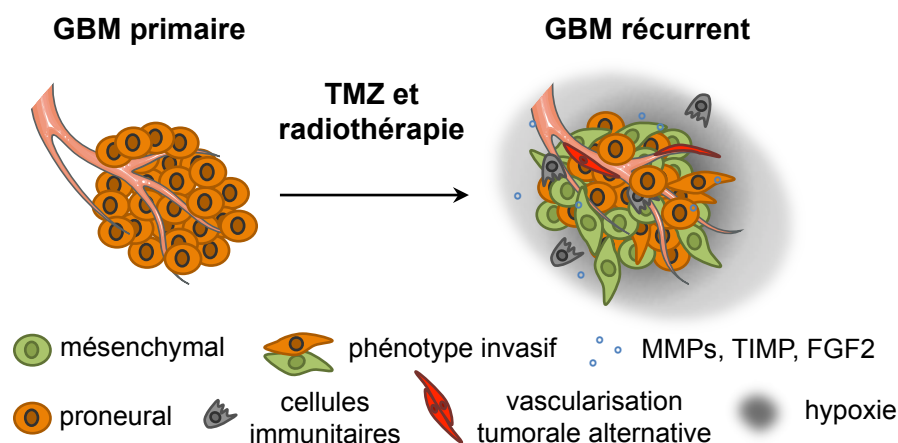


Figure 18. Causes potentielles des récurrences du glioblastome. Après radiochimiothérapie la tumeur réapparaît avec généralement un phénotype mésenchymal plus agressif et invasif. Ceci est associé à une hypoxie plus grande et un recrutement de cellules myéloïdes, ainsi qu'à une vascularisation insensible aux thérapies anti-VEGF.

celles-ci promeuvent le phénotype invasif, notamment par sécrétion de MMP-9 (Gabrusiewicz et al., 2014; Piao et al., 2013). La résistance est également associée à un phénotype tumoral invasif par l'expression des MMPs -2, -9, -12 ainsi que des TIMP-1 et -2, protéines de remodelage de la matrice extracellulaire (Lucio-Eterovic et al., 2009). Dans cette étude, un traitement de tumeurs intracrâniennes avec le Bevacizumab combiné à un inhibiteur des MMPs augmente la survie, soulignant ainsi le rôle de ces protéines dans la récurrence. De façon intéressante, la récurrence est également associée à une augmentation du caractère hypoxique de la tumeur (Lucio-Eterovic et al., 2009; Soda et al., 2013). L'hypoxie peut induire une différenciation de cellules cancéreuses à caractère souche en cellules endothéliales, insensibles au VEGF (Soda et al., 2011), mais également diminuer la sensibilité des vaisseaux tumoraux existants, et ainsi leur dépendance, au VEGF pour d'autres facteurs angiogéniques comme le FGF-2 (Moens et al., 2014). Finalement, l'hypoxie peut également inhiber des protéines anti-inflammatoires comme CylD (cylindromatosis) favorisant alors le recrutement myéloïde (Guo et al., 2014) et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral. Ensemble, ces mécanismes pourraient ainsi expliquer le phénomène d'augmentation de la densité vasculaire dans les tumeurs récurrentes après thérapie anti-VEGF (Figure 18) (Piao et al., 2013).

Récemment l'équipe de P. Carmeliet a identifié l'enzyme PFKFB3 comme cruciale dans le métabolisme glycolytique des cellules endothéliales de front (Moens et al., 2014). Son inhibition dans les GBM pourrait alors permettre de sensibiliser toutes les cellules

endothéliales non quiescentes, qu'elles soient issues de progéniteurs tumoraux ou non. Néanmoins, une compréhension globale et plus précise des mécanismes d'initiation du GBM, et de la résistance aux traitements conventionnels demeure pour le développement de thérapies efficaces.

II. Implication des cellules souches gliomateuses dans le glioblastome

Comme évoqué précédemment des tumeurs de même sous-type, bien qu'identiques du point de vue histologique, peuvent arborer des différences cliniques frappantes en terme de résistance au traitement et d'agressivité. Ce phénomène, que nous allons expliciter, pourrait être dû, entre autres, à la présence de cellules souches tumorales résistantes aux thérapies.

II.1 Les cellules souches gliomateuses

II.1.i Les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales (CSN) ont initialement été identifiées par J. Altman dans les années 1960 (Mariano et al., 2015). Cette découverte mis à bas le dogme stipulant que la neurogenèse était un processus s'arrêtant après la naissance, et mis en évidence qu'il existe des cellules souches neurales chez l'adulte dans des zones définies du SNC. Ces niches se trouvent à deux endroits majeurs du cerveau : la zone sous-ventriculaire (SVZ) le long du ventricule latéral, et le gyrus denté de l'hippocampe (Figure 19). La SVZ, située dans les

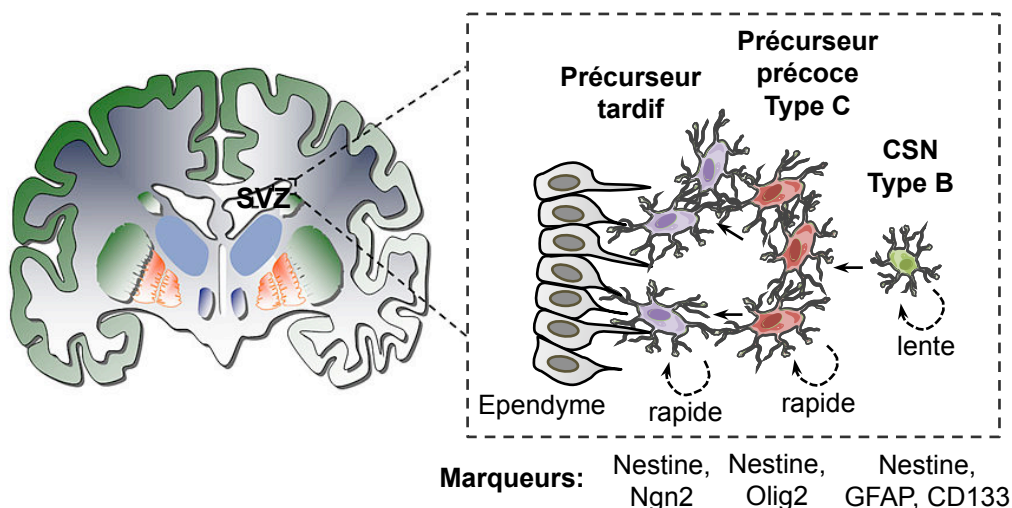


Figure 19. Organisation de la niche des cellules souches neurales adultes. Au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ) les cellules souches neurales (CSN) adultes ou Type B, à croissance lente, donne naissance aux précurseurs précoces appelés également Type C. A croissance rapide ces cellules forment les précurseurs tardifs d'oligodendrocyte, les neuroblastes et les astrocytes. (Adapté de Arias-Carrion, 2008).

parois des ventricules latéraux, constitue la plus grande réserve de cellules souches neurales (CSN) adultes. Cette paroi contient trois types distincts d'astrocytes impliqués dans la neurogenèse (de Almeida Sassi et al., 2012). Les astrocytes de type B, à potentiel prolifératif bas et considérés comme les CSN, expriment une combinaison de marqueurs Nestine⁺GFAP⁺Olig2⁻CD133⁺ (de Almeida Sassi et al., 2012). Par la stimulation avec des facteurs de croissance (BDNF, LIF), ces cellules donnent naissance aux astrocytes de type C, précurseurs neuraux Nestine⁺GFAP⁺Olig2⁺CD133⁻, ainsi qu'aux astrocytes et neuroblastes (type A). Les précurseurs oligodendrocytiques se différencient également en oligodendrocytes (de Almeida Sassi et al., 2012) et de cette façon le lignage cellulaire est bien respecté et contrôlé.

II.1.ii Identification et culture des cellules souches gliomateuses

A partir de 2002, les travaux de T. Ignatova et S. Singh ont permis d'identifier une population de cellules gliomateuses à caractère souche (CSG) au sein de tumeurs cérébrales (Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2003). Dans leurs études, les cellules sont isolées à partir de biopsies humaines de GBM, médulloblastomes et gliomes de bas grade (astrocytome pilocytique et épendymome), puis cultivées *ex vivo* de la même façon que les CSN à savoir dans un milieu riche en EGF (*Epidermal Growth Factor*) et FGF-2 (*basal Fibroblast Growth Factor*) (Reynolds and Weiss, 1992). Dans les 24 à 48 heures après la mise en culture, une partie des cellules commence à s'agréger sous forme d'amas flottants appelés neurosphères (NS) tandis que la majorité des cellules adhère et arrête de proliférer. Les NS expriment des marqueurs de CSN tels que la protéine de filament intermédiaire Nestine, le facteur de transcription Olig2, ou encore la glycoprotéine membranaire CD133 (Ignatova et al., 2002; Patru et al., 2010; Singh et al., 2003). Les NS issues de GBM peuvent être préservées en culture à très long terme jusqu'à 52 mois, sans altération de leur propriétés, ni contre-sélection (Patru et al., 2010). En outre, lorsque les NS sont dissociées mécaniquement et cultivées de façon clonale, elles ont la capacité de reformer des NS primaires dont la différenciation, induite par ajout de sérum de veau fœtal, reproduit le phénotype cellulaire de la tumeur d'origine (Singh et al., 2003). L'analyse des marqueurs microscopiques révèle que les cellules adhérentes, induites après différenciation, ont des morphologies différentes et sont négatives pour CD133 et Nestine, tandis qu'elles expriment GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et β -III tubuline. De façon intéressante, les cellules gliomateuses issues de médulloblastomes sont plus aptes à reformer des NS primaires (17.9%) et secondaires (20.3%) que les gliomes de bas grade (respectivement 1 à 8% et 5.8%) (Singh et al., 2003), suggérant donc que les CSG pourraient

jouer un rôle dans la tumorigénèse. Dans ce sens une population de CSG, positive pour CD133, a également la capacité d'induire des tumeurs dans des modèles animaux de xénogreffes multiples. Une étude a montré que l'implantation d'une centaine de CSG dans un modèle orthotopique de xénogreffe chez la Souris, engendre la formation d'une tumeur qui récapitule les caractéristiques histopathologiques de la tumeur humaine dont elles sont issues. En outre, lorsque les CSG isolées des xénogreffes sont réimplantées dans d'autres souris immunodéficientes, une tumeur identique à celle d'origine est reformée (Singh et al., 2004).

Les CSG sont donc définies par leur capacité à s'autorenouveler à long terme, leur capacité d'induire différents lignages cellulaires, et de permettre le développement d'une tumeur ressemblant à celle d'origine après transplantations successives (Figure 20).

II.1.iii Des marqueurs soumis à controverse

L'identification de marqueurs adéquats des CSG est sujette à de nombreux débats. La prominine-1, appelé aussi CD133, est reconnu comme marqueur de la population souche cancéreuse dans les leucémies, les cancers du sein et le GBM (Holmberg Olausson et al., 2014). En revanche, comme nous l'avons vu CD133 est également exprimé chez l'adulte par les CSN de la SVZ. De plus, il a été montré que CD133, CD15, Sox2, Olig2 et Nestine pouvaient ségréger de façon asymétrique lors de la mitose (de Almeida Sassi et al., 2012). Ceci permettrait alors une augmentation de l'hétérogénéité cellulaire tout en maintenant le caractère souche et arguant dans le sens de CD133 en tant que marqueur souche des GSC (Figure 20).

En revanche plusieurs études ont démontré que des xénogreffes orthotopiques de cellules CD133⁻ permettaient, tout comme les cellules CD133⁺, d'induire un

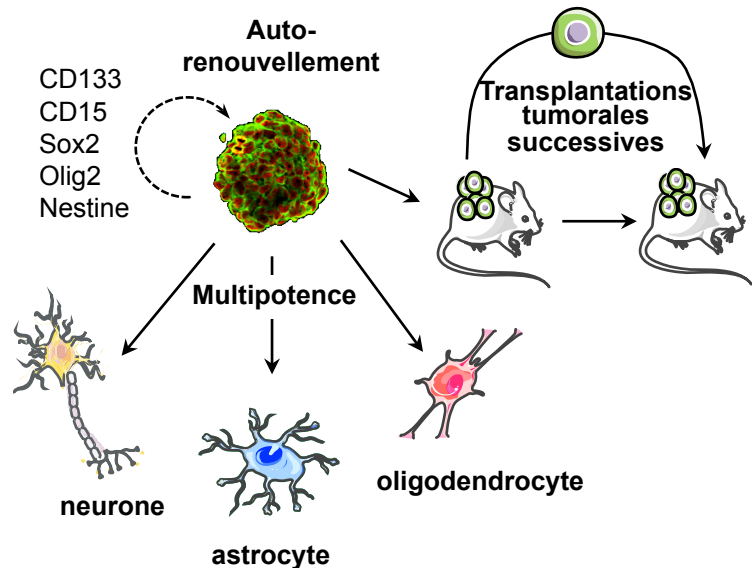


Figure 20. Caractéristiques et marqueurs des cellules souches gliomateuses. Les cellules souches gliomateuses expriment classiquement CD133, Nestine et Sox2, s'autorenouvellent sous forme de neurosphères et peuvent être induites à différencier en plusieurs types cellulaires. La transplantation successive de ces cellules dans des xénogreffes murines reforme une tumeur semblable à celle d'origine.

développement tumoral récapitulant la tumeur d'origine. En outre, *in vitro* ces cellules forment des NS primaires et peuvent être induites à se différencier en cellules neurales (Chen et al., 2010; Son et al., 2009). Sur la base du marqueur CD133, trois types cellulaires ont été identifiés dans les GBM. Les types I et II sont respectivement CD133⁻ et CD133⁺ mais peuvent tout deux donner naissance à des cellules CD133^{+/-}; tandis que le type III est CD133⁻ et ne peut former que des cellules CD133⁻ (Chen et al., 2010). D'autre part, ces trois types cellulaires peuvent générer des NS primaires *in vitro*, et des xénogreffes orthotopiques à phénotypes cellulaires différents chez la souris. Il apparaît néanmoins que le développement de tumeurs intracrâniennes avec le type III est deux fois plus long que les types I ou II (24 vs 12 semaines). De plus, après dissociation des NS primaires les cellules ne peuvent plus reformer de NS secondaires (Chen et al., 2010). Une autre étude a mis en lumière l'expression de CD15 dans la majorité des cellules dépourvues de CD133 et pouvant récapituler les caractéristiques des CSG *in vivo* et *in vitro*. Enfin, les cellules CD15^{+/-}CD133⁺ sont plus aptes à former des tumeurs que les cellules CD15^{+/-}CD133⁻ (Son et al., 2009). Sur la base de ces résultats, un modèle définitif ne peut être proposé. Toutefois nous pouvons placer les cellules de type I et II comme les cellules se rapprochant davantage des CSG et exprimant les marqueurs CD15, CD133, Nestine, Sox2 et Olig2, tandis que les cellules de type III seraient des progéniteurs intermédiaires (Chen et al., 2012; Chen et al., 2010).

Ainsi la caractérisation fine de la population de CSG n'est pas encore parfaite mais tend à se préciser par association de nombreux marqueurs comme c'est le cas actuellement pour les cellules souches hématopoïétiques. En outre, le rôle de CD133 est délicat à définir car il a été montré que son expression était modulée par des facteurs environnementaux tels que la tension en oxygène, facteur pouvant varier au sein et en dehors de la niche vasculaire (Chen et al., 2007).

II.1.iv L'origine des CSG et la notion de lignage

L'étude caryotypique de CSG, positives pour CD133¹⁴, a très tôt identifié un large panel d'aberrations chromosomiques telles que des délétions des chromosomes 10 et 16, ainsi que des gains sur le chromosome 18 (Singh et al., 2003). Ceci rappelle alors l'hypothèse d'A. Knudson sur l'apparition des cancers en deux coups (*two-hits mechanism*) par mutation d'un oncogène tel que Myc, et d'un gène suppresseur de tumeur comme p53. Depuis ces travaux, de nombreux modèles animaux de développement spontané de gliomes ont été générés.

¹⁴ Malgré la controverse sur CD133, nous le considérons ici comme marqueur des CSG

a) Le rôle précoce de *TP53*

Une grande majorité des gliomes, tout grade confondus, exhibe une mutation dans le gène *TP53* suggérant un rôle initiateur précoce dans la tumorigenèse (Figure 21). Afin d'étudier ce phénomène, plusieurs études ont recouru à l'invalidation conditionnelle de différents gènes en ciblant les CSN adultes et leurs progéniteurs via l'expression de la recombinaise Cre sous le promoteur GFAP (hGFAP-Cre). De cette façon, au terme de six mois post-naissance, les souris exprimant une version tronquée de p53 (exons 5 et 6 délétés empêchant son activité transcriptionnelle) développent dans 90% des cas des gliomes de haut grade (Wang et al., 2009). De plus, l'analyse biochimique des cellules tumorales issues de ces gliomes révèle une activation anormale des voies de régulation du cycle cellulaire (Rétinoblastome : Rb1) et des récepteurs tyrosine kinase tels que PDGF et EGFR. De façon intéressante, lors des premiers mois après la naissance, la forme tronquée de p53 est majoritairement restreinte dans la SVZ et exprimée par les CSN adultes de type B ainsi que les précurseurs neuraux de type C (Figure 19) (Wang et al., 2009). Associé au fait que les mutations de p53 ne semblent pas induire un avantage prolifératif, ces résultats suggèrent que p53 serait une mutation initiatrice permettant l'accumulation pléiotropique d'aberrations génétiques.

Dans ce modèle de gliomagenèse, le fait que les cellules de type B engendrent les cellules de type C suggère qu'un lignage normal semble maintenu dans les CSG invalidées pour p53. Cette observation a été vérifiée par utilisation d'un vecteur R26R-LacZ activée par la recombinaise Cre dans les cellules exprimant la forme tronquée de p53. Les cellules ainsi marquées par la β -galactosidase confirment le lignage entre les CSG et les précurseurs ainsi formés (Wang et al., 2009).

b) PTEN et la gliomagenèse

Outre p53, *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*) est muté par perte d'hétérozygotie dans 70% des gliomes de haut grade. PTEN est un suppresseur de tumeur dont la mutation prévient, entre autres, la dégradation de l'EGFR et l'inhibition de la voie PI3K/AKT afin de modérer la prolifération cellulaire (Ferrarese et al., 2014). Plusieurs équipes ont étudié l'association des mutations de *P53* et *PTEN* en utilisant le reporteur hGFAP-Cre dans un modèle animal. Lorsque ces gènes sont conjointement invalidés, les individus développent plus rapidement des gliomes de haut grade que ceux invalidés pour l'un ou l'autre séparément (Zheng et al., 2008). Du point de vue génétique, l'analyse génotypique des tumeurs révèle de nombreuses amplifications (nombre de copie, CN>3) et délétions (CN<1.5) telles que l'amplification de l'*Egfr* et *Pdgfr* (Chow et al., 2011). De plus, les CSG isolées arborent également une activation aberrante de l'oncogène Myc, associée à une suractivation de la voie

PI3K/AKT et de la production du VEGF. En outre, une extinction stable, par ARN interférent, de l'expression de Myc dans ces CSG prévient la formation de NS et la croissance tumorale de xénogreffes orthotopiques. En revanche, les cellules mutées pour p53 et PTEN affichent un défaut de la différenciation cellulaire, caractérisé par une plus faible proportion de cellules adhérentes positives pour GFAP ou O4 (marqueur oligodendrocytique), qui est restauré par l'extinction de Myc (Zheng et al., 2008). Ainsi, même si le lignage cellulaire des CSG et progéniteurs semble être conservé dans ces modèles de gliomagenèse, le processus de différenciation finale reste anormal.

c) Rb1 comme autre pression de sélection

Finalement, la troisième voie majeure dérégulée dans les GBM est celle de la protéine Rb évoquée précédemment. Une inactivation conditionnelle de *P53*, *PTEN* et *Rb1* dans le compartiment exprimant GFAP aggrave la mortalité des souris. De façon intéressante, l'étude des dérégulations génétiques de ces tumeurs n'indique pas d'amplification de *Egfr* et *Pdgfr* comme retrouvé chez les individus invalidés pour p53 et PTEN (Chow et al., 2011). Cette observation suggère donc que Rb1 coopère avec p53 et PTEN lors de la gliomagenèse, mais qu'il est responsable d'une pression de sélection différente étant donné l'absence d'amplification des récepteurs tyrosine kinase.

Ensemble, ces différents modèles animaux démontrent que l'apparition des CSG serait vraisemblablement due à l'accumulation successive de mutations dans une CSN adulte ou un progéniteur normal. L'addition de plusieurs mutations oncogéniques, associée à une pression de sélection Darwinienne, conduirait *in fine* à l'apparition d'un clone cancéreux de CSG (Figure 21). Nous verrons par la suite que ce processus n'est pas aussi figé et linéaire qu'il y paraît et que des reprogrammations peuvent survenir lors du développement tumoral.

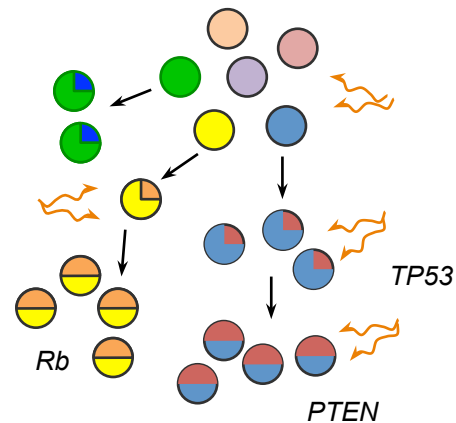


Figure 21. Modèle clonal de la gliomagenèse. L'analyse des mutations dans différents modèles de glioblastome révèle un rôle précoce de P53 qui, une fois muté, promeut l'accumulation d'autres mutations comme Rb, PTEN, EGFR.

II.2 Les cellules souches gliomateuses

Depuis les dix dernières années, des progrès conséquents dans la compréhension des cellules souches ont permis de mieux appréhender ces cellules et leur régulation, mais aussi de concevoir qu'elles soient impliquées dans le développement tumoral. Il est maintenant reconnu que les CSG participent à l'initiation tumorale et à la résistance aux thérapies actuelles, par de nombreux mécanismes moléculaires identifiés dont nous détaillons plusieurs d'entre eux.

II.2.i Initiation tumorale et autorenouvellement

Comme démontré par S. Singh dès 2004, des xénogreffes orthotopiques avec seulement une centaine de cellules CD133⁺ issues de patients produisent des tumeurs identiques à celle d'origine (Singh et al., 2004). Ces résultats soulignent donc que les CSG peuvent initier le processus de développement du GBM. En revanche, la dissociation de l'initiation tumorale et de l'autorenouvellement est délicate puisque le second est nécessaire à la première. En effet, les CSG doivent également maintenir leur autorenouvellement tout en se différenciant (division asymétrique évoquée précédemment) afin de former la majorité du volume tumoral.

a) EZH2 et STAT3

L'équipe dirigée par J. Rich a démontré le rôle de EZH2, une méthyltransférase membre du complexe de répression Polycomb, dans l'autorenouvellement et la survie des CSG. EZH2 est surexprimée dans les gliomes de haut grade, et des expériences d'immunoprécipitation ont démontré son interaction avec STAT3 uniquement dans les CSG, ce qui n'est pas le cas dans les lignées gliomateuses U87 et U251 (Kim et al., 2013). STAT3 est un acteur oncogénique majeur des GBM, et a récemment été caractérisé comme impliqué dans l'autorenouvellement des CSG sous l'effet du facteur de transcription FOXM1 dans les gliomes de haut grade (Gong et al., 2015). Il apparaît que l'utilisation d'inhibiteur chimique, ou l'extinction de façon stable par ARN interférent de EZH2, diminue le développement tumoral de xénogreffes ectopiques et orthotopiques. Par la suite, en faisant exprimer différentes constructions de EZH2 à des CSG, les auteurs ont identifié que la phosphorylation par AKT du résidu sérine S21 de EZH2, provoquait son interaction avec STAT3. EZH2 peut alors ajouter un groupement méthyl sur le résidu lysine K180 de STAT3, augmentant l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Kim et al., 2013). Ainsi, en surexprimant EZH2 les CSG peuvent enclencher leur autorenouvellement via la voie STAT3, mais également par répression directe de la chromatine d'autres gènes cibles comme une autre équipe l'a démontré plus tôt (Suva et al., 2009).

b) Nrp-1 pivot autour du VEGFR-2 et Séma3C

Des récepteurs que nous avons précédemment décrits lors de l'angiogenèse sont également impliqués dans l'autorenouvellement des CSG. Dans ce sens, P. Hamerlik du laboratoire de J. Rich, a montré que dans la niche périvasculaire¹⁵ du GBM, VEGFR-2 et Nrp-1 sont préférentiellement coexprimés au sein de la population de CSG exprimant fortement CD133⁺ (Hamerlik et al., 2012). De plus, l'analyse fine de biopsie de patients et l'étude par cytométrie en flux montrent que VEGFR-2 et Nrp-1 sont principalement exprimés dans le cytosol. Cette localisation s'opère lorsque le VEGF se fixe sur son récepteur, puisque ce phénomène est perdu par traitement des CSG au Bevacizumab. En outre, il apparaît que le couple VEGFR-2/Nrp-1 est recyclé dans les endosomes précoces puis recyclé vers la membrane. Cette boucle autocrine persistante permet la survie des CSG puisque l'extinction stable par ARN interférent de VEGFR-2 dans les CSG diminue leur propriété d'autorenouvellement et augmente l'apoptose (Hamerlik et al., 2012). Comme nous l'avons vu, la neuropiline est également un corécepteur des sémaphorines. Dans ce sens, la Séma3C apparaît surexprimée dans les CSG, et ce de façon spécifique puisque les CSN adultes et précurseurs de la SVZ ne sont pas positifs pour ce marqueur (Man et al., 2014). Les CSG et CSN expriment également les récepteurs Plxn-A2/D1 et Nrp-1, dont l'expression est perdue après différenciation. De même, l'extinction stable de Séma3C ou des Plxn-A2/D1 par ARN interférent engendre une induction de l'apoptose caspase dépendante et une diminution de l'autorenouvellement des CSG, alors que les CSN adultes ne sont pas affectées. De façon intéressante ce phénomène est empêché par l'ajout de Séma3C recombinante, concluant ainsi sur la spécificité d'action de cette molécule pour ce mécanisme (Man et al., 2014). En outre, le développement de tumeurs intracrâniennes avec des CSG exemptes de Séma3C est complètement aboli. L'analyse plus poussée de la voie de signalisation impliquée par expression d'une forme constitutivement active de Rac1 dans les CSG, révèle que, via le complexe Plxn-A2/D1/Nrp-1, la Séma3C active Rac1 et la voie NF-κB pour assurer la survie cellulaire (Man et al., 2014). Ainsi, la Nrp-1 est un facteur important au cœur d'au moins deux voies cellulaires promouvant la survie des CSG, mais également impliqué dans l'angiogenèse, le développement neuronal et le recrutement de cellules immunitaires (Casazza et al., 2013).

¹⁵ Niche vasculaire du glioblastome développée dans la partie II.3 de ce chapitre

c) Gremlin1 et la voie BMP

Les CSG peuvent également adopter des stratégies plus complexes comme la sécrétion de molécules qui contrecarrent l'effet différenciateur de facteurs solubles comme le cas du BMP (Yan et al., 2014a). La différenciation tumorale est un processus crucial pour la tumorigenèse, en effet une tumeur constituée majoritairement de CSG n'aurait vraisemblablement pas le potentiel prolifératif suffisamment grand pour être réellement néfaste. Gremlin1, antagoniste de la voie BMP, peut être sécrété par les fibroblastes tumoraux, ou les CSG elles-mêmes, dans le but de prémunir les CSG de la différenciation induite par le BMP, mais également pour faire proliférer les cellules différenciées. Inversement, lorsque Gremlin1 est surexprimée *in vitro* dans des CSG différenciées, ces dernières présentent une augmentation du marqueur souche Sox2 et à l'inverse une répression de GFAP (Yan et al., 2014a). Ceci suggère donc que les CSG n'ont pas un devenir figé mais sont relativement plastiques.

II.2.ii Vascularisation alternative par les cellules tumorales

a) Mimétisme vasculaire

A partir d'études sur le mélanome, il a été identifié que les cellules cancéreuses pouvaient générer un réseau tubulaire pouvant conduire le sang de façon similaire aux vaisseaux sanguins (Figure 22). En 2010, deux groupes indépendants ont décrit ce processus dans le GBM. L'étude française est principalement descriptive avec la caractérisation de vaisseaux exprimant des duplications génétiques de l'*Egfr* dans des biopsies GBM (El Hallani et al., 2010). Il a ensuite été montré *in vitro*, dans du Matrigel, que des lignées gliomateuses pouvaient s'associer à des HUVEC pour former des tubes vasculaires (Shaifer et al., 2010). Bien que les tubes issus de cette coculture soient résistants aux traitements anti-angiogéniques (inhibiteur du domaine kinase de VEGFR-2) (Shaifer et al., 2010), les données sont contradictoires concernant les cellules gliomateuses seules. En effet, dans un cas les tubes vasculaires formés par celles-ci sont insensibles (Shaifer et al., 2010), ou dépendants (Francescone et al., 2012) du VEGFR-2. Dans cette dernière étude, l'inhibition stable *in vitro* et *in vivo* par ARN interférent contre VEGFR-2 diminue la voie de signalisation dépendante du VEGF, mais également la croissance tumorale et le mimétisme vasculaire.

b) Trans-différenciation des CSG en cellules endothéliales

Dès 2004, il a été montré que les CSN adultes étaient plastiques et pouvaient se différencier en cellules endothéliales lorsqu'elles sont cultivées avec ces dernières (Figure 22) (Wurmser et al., 2004). Dans ce sens, à la fin de l'année 2010, trois études d'équipes indépendantes ont mis en lumière la capacité des CSG à se différencier en cellules endothéliales (Ricci-Vitiani et

al., 2010; Soda et al., 2011; Wang et al., 2010). Ces travaux controversés ont identifié par FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), au sein de biopsies de GBM, des cellules exprimant des marqueurs endothéliaux (PECAM, VE-cadhérine, Endogline), ainsi que des aberrations génomiques, telles que des amplifications d'*Egfr* (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). De plus, le développement de tumeurs orthotopiques par xénogreffes de CSG (Ricci-Vitiani et al., 2010), ou de modèle génétique de souris à génération spontanée de GBM (*H-Ras*, *AKT* et *P53* muté sous contrôle GFAP-Cre) (Soda et al., 2011), conduisent à la formation de cellules endothéliales tumorales (tEC) exprimant des marqueurs de CSG. Selon

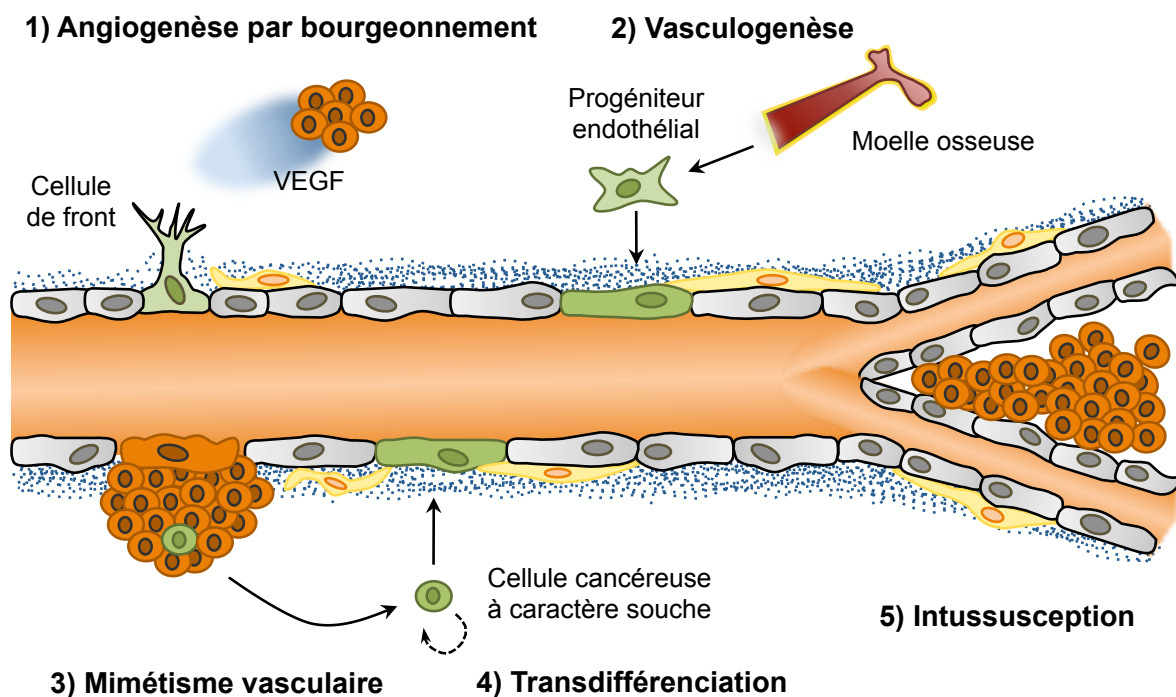


Figure 22. Les différents modes de formation des vaisseaux tumoraux. 1) L'angiogenèse par bourgeonnement dépend des gradients en VEGF et conduit à la sélection d'une ou plusieurs cellules de front, 2) le recrutement *de novo* de précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse, 3) le mimétisme vasculaire des cellules tumorales et l'incorporation directe de vaisseaux sanguins, 4) la transdifférenciation endothéliale de cellules tumorales à caractère souche, et 5) la séparation d'un vaisseau sanguin par intussusception afin d'augmenter la ramification des vaisseaux tumoraux.

les études, les proportions de ces tEC issues de CSG varient de 0.8-1.4% (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010) jusqu'à 25% (Soda et al., 2011), et il en va de même pour la caractérisation des marqueurs avec une ambiguïté pour le VEGFR-2 différemment exprimé selon les travaux. Il est intéressant de constater qu'*in vitro* les CSG peuvent générer des tEC qui récapitulent des propriétés endothéliales telles que la formation de tubes vasculaires et l'incorporation de lipides spécifiques (Ac-LDL, *Acetylated-Low Density Lipoprotein*) (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). Il en est de même *in vivo* où ces tEC semblent former

des vaisseaux fonctionnels analysés par perfusion des tumeurs avec la lectine biotinylée (Soda et al., 2011; Wang et al., 2010). La plasticité des CSG est ainsi mise en avant, car les CSG CD133⁺VE-Cadhérine⁻ peuvent donner naissance, soit à des progéniteurs endothéliaux dans des conditions de culture endothéliales, soit à des cellules exprimant GFAP et Nestine en condition de culture neurale (Wang et al., 2010). La preuve formelle que les cellules gliomateuses se différencient en cellules endothéliales a été apportée par différentes approches telle que la génération de CSG exprimant de façon stable la thymidine kinase sous contrôle du promoteur Tie2¹⁶. Ainsi, les cellules exprimant Tie2 dans des xénogreffes orthotopiques sont sensibles au Ganciclovir, et un traitement des souris avec cet inhibiteur de la réplication engendre des cellules Tie2⁺ en apoptose (marquage TUNEL) (Ricci-Vitiani et al., 2010). L'étude de Y. Soda approfondit davantage le mécanisme d'apparition des tEC par analyse du caractère hypoxique des GBM. En effet, les tEC sont préférentiellement retrouvées dans la zone centrale de la tumeur (Ricci-Vitiani et al., 2010; Soda et al., 2011), lieu où HIF est hautement activé (Soda et al., 2011). L'étude *in vitro* des CSG soumises à des conditions hypoxiques par traitement au DFO (Desferoxamine), un chélateur du fer, ou par culture en faible concentration d'oxygène, révèle que presque la moitié des CSG expriment vWF ou PECAM et peuvent former des tubes vasculaires (Soda et al., 2011). A noter que cette proportion élevée de tEC pourrait ne pas refléter la réalité, car les autres études ne détectent pas une aussi grande représentation. Néanmoins, le traitement de GBM génétiquement induit avec un inhibiteur des récepteurs au VEGF (AG28262) engendre une augmentation du nombre de tEC intratumoral suggérant alors une résistance aux traitements ciblant le VEGF et pouvant expliquer les résistances aux thérapies actuelles (Soda et al., 2011).

c) La trans-différenciation des CSG en péricytes

La différenciation de CSG en lignage péricytaire a également été documentée par l'observation, dans des GBM, d'une coexpression de marqueurs de péricytes (α -SMA, Neurogénine Ngn2, ou Desmine) et de Sox2 autour des vaisseaux (Figure 22). De plus, des CSG exprimant de façon stable la GFP sous contrôle du promoteur de la Desmine, forment des xénogreffes dans lesquelles les cellules GFP coexpriment la Ngn2, et sont disposées autour des vaisseaux marqués par PECAM (Cheng et al., 2013). Tout comme la trans-différenciation endothéliale, l'étude par FISH dans un modèle de souris de GBM révèle une amplification d'*Egfr* et une perte d'hétérozygotie de *PTEN* dans les cellules exprimant des marqueurs de péricytes. L'implication de ces péricytes dans la gliomagenèse a ensuite été

¹⁶ Tie-2 ciblant le compartiment endothélial et développé dans le chapitre I, III.3.i.

étudiée en utilisant un modèle de xénogreffe avec des CSG GFP⁺ exprimant la thymidine kinase sous contrôle du promoteur Desmine. Après traitement des animaux au Ganciclovir, les péricytes issues des CSG entrent en apoptose (comarquage TUNEL et GFP) et ceci conduit à une réduction de la croissance tumorale et un taux de survie augmenté (Cheng et al., 2013). D'autre part, des études de coculture *in vitro* entre des CSG, invalidées de façon stable par ARN interférent, et des cellules endothéliales cérébrales hBMEC ont permis d'impliquer le récepteur CXCR4. Enfin, le TGF- β sécrété par les cellules endothéliales est crucial pour la différenciation des CSG en péricytes, puisque celle-ci est bloquée par l'utilisation de milieu conditionné de hBMEC associé à un anticorps neutralisant le TGF- β (Cheng et al., 2013). Ainsi, de par les possibles diaphonies entre les voies TGF- β et Notch-1, au travers des facteurs de transcription Smad, une récente étude a ainsi caractérisé l'implication de la voie Notch dans la trans-différenciation des CSG en péricyte (Guichet et al., 2015).

II.2.iii Résistance aux traitements

a) Une vascularisation tumorale résistante

Comme nous venons de le voir, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes comme la trans-différenciation et le mimétisme vasculaire afin de palier le manque d'oxygène mais également leur permettant d'échapper aux thérapies. Dans ce sens, la coculture entre cellules gliomateuses et HUVEC engendre *in vitro* des tubes résistants aux irradiations (Shaifer et al., 2010) et insensibles au Bevacizumab (Francescone et al., 2012). En accord avec cette observation, le mimétisme vasculaire est corrélé aux gliomes de hauts grades et à un mauvais pronostic (Liu et al., 2011). En outre, comme nous allons l'expliquer, l'hypoxie est un acteur majeur de la résistance tumorale, et induit le développement de la trans-différenciation des CSG en cellules endothéliales (Ricci-Vitiani et al., 2010; Soda et al., 2011). Un autre aspect important est la reprogrammation des cellules endothéliales après traitement anti-VEGF. En effet, il a été caractérisé que des cellules endothéliales microvasculaires humaines non néoplasiques ou issues de biopsies de glioblastome, deviennent réactives aux VEGF-C et -D en formant des tubes en Matrigel après exposition *in vitro* à long terme au Bevacizumab (Grau et al., 2011). La Nrp-2, qui est impliquée dans le développement lymphatique comme le prouve l'analyse des souris invalidées (Yuan et al., 2002), est également un promoteur de la dissémination métastatique (Caunt et al., 2008). En revanche, l'extinction transitoire de Nrp-2 dans des lignées U87 de glioblastome promeut une augmentation du taux de VEGF-A sécrété qui agit alors en paracrine sur les cellules

endothéliales (Coma et al., 2011). Ces observations soulignent des rôles antagonistes de la Nrp-2 dans le développement tumoral. La Nrp-2 étant également corécepteur du VEGF-C, le développement d'inhibiteur bloquant l'interaction entre ces deux acteurs (Parker et al., 2015) pourrait ainsi offrir d'intéressantes perspectives thérapeutiques en combinaison au Bevacizumab. Ainsi, ces données suggèrent que les processus alternatifs de vascularisation et de reprogrammation cellulaire sont largement impliqués dans les phénomènes de résistance.

b) Les voies de réparation de l'ADN

Comme mentionné précédemment, la principale thérapie actuelle contre le GBM consiste en une chimiothérapie, avec l'agent alkylant TMZ couplé à une radiothérapie. Le TMZ cible majoritairement les cellules en division en générant des cassures de l'ADN et en provoquant leur apoptose. Dès 2006, il a été reporté que ce phénomène n'est pas effectif dans les CSG, qui apparaissent résistantes et même enrichies dans la population tumorale restante de xénogreffes irradiées (Bao et al., 2006a; Pietras et al., 2014). L'analyse biochimique de cellules gliomateuses irradiées montre que la voie de réparation de l'ADN, médiée par la phosphorylation des kinases ATM et Chk1/2, ainsi que la protéine effectrice Rad17, est davantage activée dans les cellules CD133⁺ comparées aux CD133⁻. En outre, un traitement conjoint avec l'inhibiteur des kinases Chk1/2 et le TMZ abroge la résistance des cellules CD133⁺ au TMZ et diminue leur survie attestée par un test de formation de colonie (Bao et al., 2006a). Récemment, une autre protéine a été identifiée comme responsable de la résistance des cellules gliomateuses au TMZ. HOXA9 (*Homeobox protein Hox-A9*) est un facteur de transcription souvent amplifié et dont l'expression est corrélée à un mauvais pronostic dans le GBM. Une surexpression ectopique de HOXA9 dans les U87 promeut la croissance tumorale *in vivo* et la résistance des cellules au TMZ *in vitro*. De plus, HOXA9 permet d'augmenter la survie cellulaire par surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl2 puisque la combinaison d'un inhibiteur de Bcl2 et du TMZ est toxique (Pojo et al., 2015). En outre, Bcl2 permet d'inhiber la réparation de l'ADN par *Mismatch Repair* (MMR) en interagissant directement avec le complexe MSH2/6, des protéines reconnaissant certains dommages de l'ADN. Dans ce sens, des études précliniques montrent que l'inhibition du MMR est impliquée dans la résistance aux agents alkylants tels que le TMZ (Cahill et al., 2007). Le rôle de HOXA9 dans les CSG n'a pas encore été étudié mais le fait que l'expression des transcrits HOXA9 soit associée à la signature de CSG suggère un rôle similaire dans ces cellules et une cible thérapeutique potentielle. Le ciblage des kinases Chk1 et Chk2 semble également prometteur (Signore et al., 2014), et dans ce sens un recrutement

de patients atteints de cancers du sein est actuellement en cours pour un essai clinique de phase I.

c) L'export de drogues

La résistance aux traitements passe également par l'expression de pompes à efflux telle que MDR1 qui exporte les drogues hors des cellules, comme c'est d'ailleurs le cas pour les cellules endothéliales de la BHE. Dans ce sens EZH2, qui a déjà été présenté comme impliqué dans l'autorenouvellement et l'initiation tumorale, est retrouvé surexprimé dans les GBM récurrents ayant subi un traitement par radiothérapie (Kim et al., 2015). EZH2 a été montré comme interagissant avec MELK, une sérine thréonine kinase régulateur de l'oncogène FOXM1, dont l'expression est facteur de mauvais pronostic dans les GBM. De façon intéressante, une extinction stable par ARN interférent de MELK dans les CSG sensibilise les tumeurs intracrâniennes aux irradiations (Kim et al., 2015). FOXM1 permet de plus l'autorenouvellement des CSG via l'activation de STAT3, et une inhibition de FOXM1 pourrait alors induire la mort des CSG après TMZ (Gong et al., 2015). Ainsi, un ciblage de MELK et de EZH2 associé à la radiothérapie pourrait s'avérer un moyen efficace de sensibiliser les CSG. Dans ce sens, un inhibiteur de EZH2 est d'ailleurs en essai clinique de phase I/II dans les lymphomes.

II.2.iv Nouvelles thérapies par ciblage des CSG

Comme nous l'avons vu, les CSG apparaissent comme des acteurs essentiels de la tumorigenèse du GBM. L'étude rétrospective d'échantillons de gliomes humains montre que la fréquence de cellules CD133⁺ augmente avec le grade, et que la présence de ces cellules est corrélée à un mauvais pronostic (Zeppernick et al., 2008). L'étude de J. Chen a également conduit à la même conclusion en modifiant génétiquement des souris exprimant la thymidine kinase sous contrôle du promoteur Nestine afin de rendre les CSN et progéniteurs neuraux sensibles à la Ganciclovir (Chen et al., 2012). En croisant ces souris avec des animaux GFAP-Cre-Nf1^{fl/+}p53^{fl/+}PTEN^{fl/+}, générant des GBM de façon spontanée au cours du développement, les CSN et progéniteurs deviennent alors apparentés aux CSG. De façon intéressante, le traitement au TMZ n'a presque aucun effet, alors que le Ganciclovir seul ou associé au TMZ augmentent considérablement la survie des animaux croisés (Chen et al., 2012). Ceci souligne donc le besoin de nouvelles thérapies, ciblant spécifiquement cette population tumorale initiatrice, et pouvant également traverser la BHE. Hormis les nouvelles drogues en cours d'essai clinique dont nous avons précédemment fait mention, de nouvelles techniques originales émergent afin de cibler au mieux cette population souche.

Dans ce sens, des travaux récents ont analysé l'effet d'un anticorps monoclonal contre la forme humaine de l'EGFR (Cetuximab, apparenté à l'Erbix), conjugué à des nanoparticules d'oxyde de fer (IONP, *Iron-Oxide NanoParticles*) (Kaluzova et al., 2015). Ce vecteur, entouré de polyéthylène glycol afin d'éviter les interactions cellulaires aspécifiques, peut être internalisé par les CSG *in vitro* et observé par IRM dans des modèles de tumeurs intracrâniennes résultantes de l'implantation de cellules gliomateuses (CSG ou U87) exprimant l'EGFRvIII ou sauvage. Dans tous les cas l'apoptose induite par ce vecteur permet d'accroître le taux de survie des animaux (Kaluzova et al., 2015). Un autre type d'approche permet quant à elle de cibler spécifiquement les CSG en utilisant des anticorps bi-spécifiques avec la fusion d'une partie ciblant CD133 et une autre dirigée contre CD3, le récepteur des lymphocytes T (Prasad et al., 2015). De cette façon, l'utilisation de cet anticorps bi-spécifique dans un modèle de xénogreffe orthotopique permet de recruter les lymphocytes T spécifiquement et directement aux CSG. Ce type d'approche n'engendre pas d'effet néfaste sur les cellules souches hématopoïétiques exprimant également CD133 (Prasad et al., 2015).

Pour finir, un autre outil a récemment été développé et semble encourageant dans le ciblage spécifique des CSG. Il a été montré que les cellules gliomateuses, sans distinction aucune, possèdent une haute capacité à internaliser l'acide folique, propriété qui n'est pas partagée par les cellules cérébrales normales. Un vecteur constitué de trois fragments d'ARN associés ensemble et couplés à un fluorochrome ainsi qu'à l'acide folique a été développé (AF-Alexa-pRNA-3WJ RNP) (Lee et al., 2015). De façon intéressante, cette construction peut contenir

une séquence d'ARN interférent ciblant une cible particulière, dans cette étude pionnière l'ARN cible la luciférase (Figure 23). Les auteurs ont montré que ce vecteur à ARN AF-Alexa-pRNA-3WJ RNP peut être internalisé dans les U87 et les CSG *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe orthotopique avec des cellules exprimant la luciférase. Après développement tumoral et traitement par le vecteur, l'expression de la luciférase est diminuée dans les zones marquées par le fluorochrome prouvant ainsi l'efficacité de

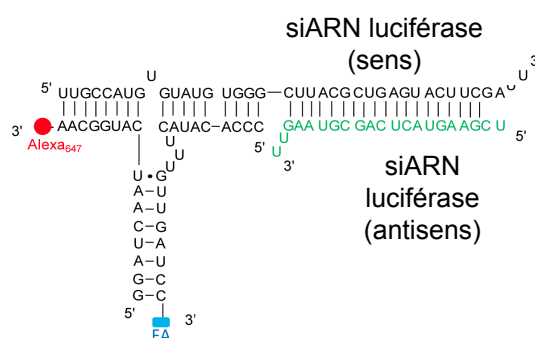


Figure 23. Structure du vecteur FA-Alexa-pRNA-3WJ siLuc. Ce vecteur est constitué de trois fragments d'ARN dont un ARN interférent contre la Luciférase (vert). Un fluorochrome est également présent (rouge), ainsi que l'acide folique (FA, bleu) permettant l'entrée du vecteur dans la cellule par le récepteur à l'acide folique. (Adapté de Lee et al., 2015).

l'ARN interférent (Lee et al., 2015). En outre, le fait que ce vecteur s'accumule uniquement dans le cerveau, et qu'il soit détoxifié dans le rein, permettrait de cibler plus précisément les cellules gliomateuses qu'une chimiothérapie classique sans dommages majeurs aux cellules saines, notamment les cellules sanguines circulantes.

II.3 La niche vasculaire, un environnement protecteur des CSG

II.3.i Découverte et rôle

Une étude pionnière a identifié des cellules positives pour le marqueur CD133, en étroite association avec les vaisseaux sanguins au sein de médulloblastome. De façon intéressante, lorsque cette observation est mimée *in vitro* par des expériences de coculture de cellules issues de médulloblastomes ou de glioblastomes, avec des cellules endothéliales primaires, les CSG s'associent préférentiellement aux cellules endothéliales, plutôt qu'à des astrocytes (Calabrese et al., 2007). Cette observation est confirmée par des xénogreffes orthotopiques puisque l'initiation tumorale induite par des CSG isolées de médulloblastome est accélérée en conjugaison avec des cellules endothéliales. En outre, l'utilisation du Bevacizumab diminue non seulement la densité vasculaire, mais aussi la proportion de CSG (Calabrese et al., 2007). Ensemble, ces résultats soulignent un rôle instrumental de la niche vasculaire quant à l'initiation tumorale. En revanche, dans cette étude les mécanismes cellulaires mis en jeu ne sont pas explorés, aussi nous allons nous efforcer de décrire des exemples argumentés.

II.3.ii Rôle de l'endothélium dans la survie des CSG

La niche vasculaire est composée des cellules souches cancéreuses, de la matrice extracellulaire, et comme on vient de le voir, des cellules endothéliales (Calabrese et al., 2007). Les contacts entre ces deux types cellulaires sont particulièrement importants et plusieurs études ont montré l'implication de récepteurs membranaires tel que l'intégrine- $\alpha 6$, et récemment JAM-A, dans les interactions entre endothélium et CSG (Lathia et al., 2010; Lathia et al., 2014). Via une analyse large par cytométrie en flux de cellules gliomateuses issues de biopsies de GBM, JAM-A a été identifié comme surexprimé par les CSG *in vitro* et *in vivo* mais également associé à un mauvais pronostic chez les patients (Lathia et al., 2014). D'autre part, une diminution stable de l'expression de JAM-A par ARN interférent engendre une apoptose des CSG, mais pas des CSN adultes. Pour finir, la croissance tumorale avec ces CSG dénuées de JAM-A est drastiquement diminuée dans les xénogreffes orthotopiques (Lathia et al., 2014). Ainsi, même si le rôle de JAM-A dans les interactions cellules

endothéliales-souches au sein de la niche n'est pas encore détaillé, cette molécule d'adhérence serait impliquée dans l'autorenouvellement et la survie des CSG.

Une autre étude met en lumière de façon claire l'implication de la voie Notch au sein de la niche vasculaire du GBM (Zhu et al., 2011). Cette voie est particulièrement intéressante, puisqu'il a été montré que l'inhibition de la γ -sécrétase réduit la fraction de CSG *in vitro* et abroge la croissance tumorale et *in vivo* (Fan et al., 2010). Dans ce travail, l'observation de biopsies de glioblastome humain révèle que les cellules exprimant Notch et Nestine sont identiques, et que les marquages DLL1 et JAG4 (tout deux des ligands de la voie Notch) sont situés sur les vaisseaux proches des cellules Notch⁺Nestine⁺ (Zhu et al., 2011). De fait, il semble que les CSG, exprimant le récepteur Notch, peuvent être induites par les cellules endothéliales arborant les ligands DLL1 et JAG4. Dans ce sens, la stimulation *in vitro* des CSG avec une forme soluble des ligands de Notch induit une augmentation de la population souche exprimant les marqueurs CD133 et CD15. Par la suite, des expériences d'extinction stable de JAG1 par ARN interférent dans les cellules endothéliales hBMEC, puis de xénogreffes orthotopiques mixées avec des CSG révèlent que les tumeurs sont plus petites tandis que le nombre de cellules CSG est réduit (Zhu et al., 2011). Ainsi, au sein de cette niche, les cellules endothéliales apportent des signaux de survie et d'autorenouvellement par contact direct avec les CSG, mais des facteurs diffusibles peuvent également contribuer. En effet, notre laboratoire a montré que la survie des CSG est dépendante de la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), activée par des facteurs diffusibles sécrétés par les cellules endothéliales de la niche périvasculaire (Galan-Moya et al., 2011; Galan-Moya et al., 2014).

II.3.iii CSG et modulation de la biologie endothéliale

Comparée à la communication établie de l'endothélium vers les CSG, peu de données documentent le rôle des CSG sur la biologie des vaisseaux sanguins au sein de la niche vasculaire. Récemment, il a été montré que la protéine matricielle fibuline-3, exprimée par les CSG, constitue un modulateur positif puissant de l'angiogenèse tumorale (Nandhu et al., 2014). Dans les GBM, la fibuline-3 se localise majoritairement autour et sur les vaisseaux sanguins, et est corrélée à une densité et une perméabilité vasculaire au Dextran de taille 155 kDa anormalement hautes. De façon intéressante, l'injection orthotopique dans le rat de CSG invalidées de façon stable pour la fibuline-3, entraîne la formation de tumeurs qui apparaissent moins vascularisées (Nandhu et al., 2014). Par la suite, des expériences *in vitro* ont démontré que la fibuline-3 augmente le potentiel angiogénique et migratoire des cellules

endothéliales hBMEC, faisant intervenir l'activation de la voie Notch (clivage du récepteur et activation du ligand DLL4 dans les cellules endothéliales). En utilisant des inhibiteurs chimiques (TAPI-2) et une stratégie d'extinction transitoire de DLL4 dans les cellules endothéliales, les auteurs ont identifié le mode d'action de la fibuline-3. Cette protéine se lie à TIMP-3 et l'empêche d'exercer son action inhibitrice sur les protéases ADAM10/17. Ces dernières sont alors capables de cliver le domaine extracellulaire de Notch, une étape cruciale de l'activation de la voie qui permet alors aux γ -sécrétases de cliver le domaine NICD (Notch IntraCellular Domain) de Notch et d'induire la transcription des gènes cibles (Nandhu et al., 2014). Comme on l'a vu, la voie Notch est activée durant l'angiogenèse physiologique et promeut ainsi la prolifération des cellules endothéliales au sein de la niche vasculaire.

Une autre étude a mis en lumière le rôle de la Profiline-1, facteur ubiquitaire de liaison à l'actine, dont la phosphorylation sur le résidu tyrosine Y129 est augmentée dans les cellules endothéliales des GBM et corrélée à un mauvais pronostic (Fan et al., 2014). En effet, la vascularisation de xénogreffes de GBM apparaît largement diminuée dans un modèle génétique dans lequel la phosphorylation Y129 est spécifiquement abolie dans le compartiment endothélial. En outre, l'analyse *in vitro* des cellules endothéliales issues de ces tumeurs intracrâniennes révèle un changement phénotypique modéré comparé aux cellules endothéliales tumorales issues des souris sauvages (Fan et al., 2014). La phosphorylation Y129 de la Profiline-1 participerait donc aux aberrations des vaisseaux tumoraux (migration, prolifération et perméabilité). De façon intéressante, cet effet est récapitulé par la transfection transitoire des cellules endothéliales avec un ARN interférent contre HIF-1 α . L'analyse fine de la voie de réponse à l'hypoxie indique que la phosphorylation de la Profiline-1 est induite en aval de l'axe VEGFR-2/Src, sous le contrôle de facteurs angiocrines sécrétés par les cellules gliomateuses (U251). Cette phosphorylation permet de fixer VHL et l'empêche de dégrader HIF-1 α dans les cellules endothéliales (Fan et al., 2014). Ce dernier active en retour des voies autocrines et paracrines de sécrétion de facteurs tels que VEGF et FGF-2, et promeut ainsi la néoangiogenèse tumorale, la progression et la résistance du GBM.

Ainsi, au sein de la niche vasculaire, les CSG reçoivent de nombreux facteurs qui favorisent leur autorenouvellement, mais aussi leur survie après traitements thérapeutiques. C'est vraisemblablement cette population cellulaire qui est à la base de la réapparition de la masse tumorale lors de la récurrence. Aussi le ciblage spécifique de ces cellules a donc un intérêt dans l'élaboration de nouveaux traitements contre les gliomes de haut grade.

III. Les vésicules extracellulaires : un mode de communication puissant

III.1 Communication extracellulaire par vésicules

Le terme exosome est initialement apparu en 1981, pour désigner des vésicules de 40-1.000 nm à activité nucléotidase (Trams et al., 1981). Ce n'est véritablement qu'en 1987 que leur présence dans le milieu de culture de réticulocytes ovins fut reportée (Johnstone et al., 1987). Depuis, de nombreuses autres études ont identifié la production de vésicules dans le milieu. Selon le contexte et le type cellulaire étudié, un véritable florilège de noms est apparu : poussière plaquettaire, corps apoptotiques, microparticules, microvésicules, vésicules de bourgeonnement, ectosomes, oncosomes etc. (Nakano et al., 2015). Un consortium international a par la suite adopté un terme générique englobant tous ces termes, exosome y compris, sous le nom de vésicules extracellulaires (*Extracellular Vesicles*, EVs) (Witwer et al., 2013). Même si ce terme reste encore débattu, et insuffisamment connu, trois grandes classes de EVs à double membrane sont formellement reconnues (Gould and Raposo, 2013).

III.1.i Exosomes :

Ce sont les mieux caractérisées, avec un diamètre compris entre 30-100 nm, une sédimentation à 100.000 g, et des marqueurs protéiques tels que les tétraspanines CD63 et CD9, Alix, TSG101, HSP90 (*Heat Shock Protein*) ou encore Rab27a/b (Thery et al., 2009). Les exosomes auraient comme origine majeure les corps multivésiculaires (MVB : *Multi Vesicular Bodies*), obtenus par invagination, via les protéines ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), de vésicules intraluminales dans les endosomes précoces qui évoluent ensuite en endosomes tardifs (Colombo et al., 2014). Ces endosomes tardifs peuvent fusionner avec les lysosomes et être dégradés, mais aussi être dirigés vers la membrane plasmique et sécrétés sous forme d'exosomes (Figure 24). Ce dernier cas fait intervenir des protéines de fusion membranaire telles que CD63, LAMP1/2, ou les compléments majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe II. En revanche, il semble que le processus de biogenèse des exosomes n'implique pas uniquement les MVB, et qu'il ne faut pas écarter la possibilité que les exosomes dérivent directement de la membrane plasmique et forment alors des vésicules exposant certains phospholipides (Colombo et al., 2014). A la fin des années 90, les travaux de l'équipe de G. Raposo ont conduit à la découverte que ces exosomes peuvent stimuler l'activation des lymphocytes T en assurant la présentation antigénique, mettant ainsi en lumière leur rôle en tant que médiateur de la communication cellulaire dans l'immunité (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998). En effet, une analyse par microscopie électronique a démontré que des molécules du CMH de classe II sont portées

par des vésicules au sein des MVB de lignée de lymphocytes B. Par la suite, de nombreuses études transcriptomiques et protéomiques ont révélé que les exosomes comportent des ARNm, miARN, mais aussi protéines solubles et transmembranaires enrichies spécifiquement dans ces structures (Valadi et al., 2007).

III.1.ii Microvésicules :

Les microvésicules (MVs), d'un diamètre de 100-1.000 nm sont principalement produites par bourgeonnement membranaire (Figure 24). De ce fait, lors de ce processus, les phosphatidylsérines, initialement orientées vers le cytoplasme au sein de la membrane plasmique, sont réorientées vers l'extérieur par les flippases. Par conséquent, les microvésicules sont positives pour un marquage à l'Annexine V, mais comportent également des protéines reflétant la composition membranaire de la cellule d'origine, en particulier le répertoire d'intégrines et sélectines (Thery et al., 2009). Par ailleurs, l'étude des cellules cancéreuses est particulièrement informative sur la biogenèse des MVs car ces cellules arborent une production exacerbée de vésicules. Le nombre de MVs produites et relarguées dans le milieu extracellulaire est augmenté dans des cellules de carcinome cervical (HeLa) ou de cancer du sein (MDA MB231) exprimant RhoA constitutivement activé. Le mécanisme moléculaire implique en aval les protéines ROCK/LIMK et l'inhibition par phosphorylation de la cofiline, permettant alors une polymérisation de l'actine et la formation des MVs (Li et al., 2012). De la même

façon, ARF6 exprimé de façon constitutivement active stimule la voie PLD (*PhosphoLipase D*)/ERK/MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) et l'inactivation de la MLC, qui promeuvent la contractilité du réseau d'acto-myosine et la sécrétion des MVs. Comme les exosomes, ces MVs peuvent contenir des

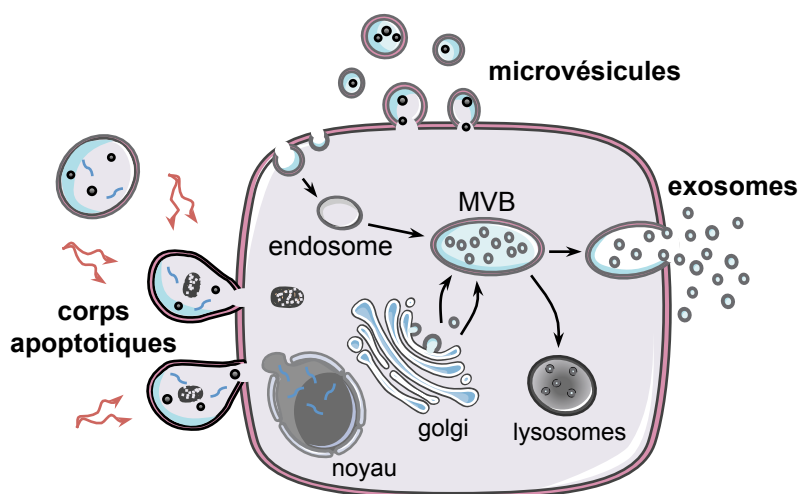


Figure 24. Les différents types de vésicules extracellulaires. Au sein de cette population hétérogène peuvent être distingués les exosomes (30-100 nm) issus des corps multi-vésiculaires (MVB), les microvésicules de 100-1.000 nm produites par bourgeonnement membranaire, et enfin les corps apoptotiques générés lors de l'apoptose.

ARNm, miARN et protéines enrichis sélectivement et entraînant une transmission d'informations spécifiques à cellules cibles (Valadi et al., 2007).

III.1.iii Corps apoptotiques :

Ces vésicules sont les plus larges avec un diamètre hétérogène de l'ordre du micromètre (1-2 μm). Formés lors de l'apoptose dépendante des caspases par bourgeonnement membranaire, les corps apoptotiques arborent, tout comme les MVs, une relocalisation de certains phospholipides en particulier des phosphatidylsérines (Figure 24). Ces vésicules contiennent de nombreuses protéines cytoplasmiques et ARNm, mais également des protéines nucléaires et de l'ADN. D'ailleurs, le seul marqueur établi de ces corps est la présence d'histones. Ceci a été montré en isolant des vésicules de cellules dendritiques traitées par rayonnements UV afin d'induire leur apoptose (Théry et al., 2001). D'un point de vue fonctionnel, l'endocytose par les macrophages de corps apoptotiques marqués avec un colorant lipophile (CFSE) implique les phosphatidylsérines exposées des corps apoptotiques (Veron et al., 2005). L'équipe de C. Théry a démontré que ce processus implique les phosphatidylsérines exposées des corps apoptotiques. Ces phospholipides sont fixés par la lactadhérine qui est ensuite reconnue par les intégrines $\alpha\beta 3$ ou $\alpha\beta 5$ des macrophages et cellules dendritiques afin de promouvoir l'endocytose de la vésicule, et l'activation de la réponse inflammatoire (Veron et al., 2005). Ceci suggère que les corps apoptotiques sont impliqués dans la présentation d'autoantigènes aux lymphocytes B et macrophages, conduisant alors à une réponse inflammatoire.

Plusieurs voies d'entrée cellulaire sont offertes à ces EVs : internalisation, fusion, ou encore endocytose via les phosphatidylsérines et récepteurs transmembranaires portés par les vésicules. D'autre part, ces vésicules extracellulaires sont retrouvées dans toutes sortes de fluides et sécrétions cellulaires : sang, lymphe, urine, sécrétions sexuelles, liquide céphalo-rachidien (LCR) (Witwer et al., 2013). En outre, elles apparaissent relativement stables et représentent, de fait, de parfaits médiateurs de la communication cellulaire que ce soit en condition physiologique, telle la régulation immunitaire, mais aussi dans des pathologies cancéreuses.

III.2 Vésicules extracellulaires et rôles dans les gliomes

Les travaux pionniers de J. Skog en 2008 ont fait émerger le concept du rôle des EVs dans la communication cellulaire des gliomes. En effet, les ARNm et les protéines contenus dans ces vésicules se retrouvent véritablement enrichis, par rapport à la cellule d'origine, d'une manière qui n'est pas encore connue (Skog et al., 2008). Ces ARNm peuvent ensuite être transférés aux cellules du microenvironnement tumoral, telles que les cellules nerveuses ou les cellules endothéliales, et modifier leur biologie. Dans ce sens, il a été montré que des EVs issues de glioblastome humain peuvent transférer, dans des cellules endothéliales, des ARNm où ils peuvent ensuite être exprimés (Skog et al., 2008). Ceci est notamment le cas pour la forme mutée du récepteur à l'EGF (EGFRvIII) qui est exprimée dans presque 50% des glioblastomes (Al-Nedawi et al., 2008). De façon intéressante, l'expression ectopique de l'EGFRvIII dans des cellules gliomateuses U373 n'exprimant pas l'EGFR, augmente drastiquement la production des EVs. D'autre part, les xénogreffes sous-cutanées avec ces cellules induisent des tumeurs à potentiel prolifératif plus grand, et qui sécrètent dans la circulation périphérique des EVs positives pour EGFRvIII (Al-Nedawi et al., 2008). En outre, la stimulation des lignées parentales U373 avec des vésicules purifiées des cellules U373-EGFRvIII suffit à induire l'expression de la forme mutée de l'EGFR, ainsi qu'une production de VEGF plus importante (Al-Nedawi et al., 2008). De manière similaire, l'analyse du profil transcriptomique des EVs dérivant de lignées gliomateuses U251 démontre que de nombreux transcrits, miARN et ARN non codants sont spécifiquement enrichis dans ces vésicules. De façon intéressante, ces vésicules purifiées permettent d'induire une réponse transcriptionnelle dans des cellules endothéliales microcérébrales humaines résultant en l'augmentation d'une quarantaine de gènes et la répression de 20 autres (Li et al., 2013).

Les exosomes sont également modulés par un environnement hypoxique tumoral. En effet, la comparaison des exosomes circulants de donneurs sains à ceux de patients atteints de glioblastome révèle une signature hypoxique flagrante (i.e. surexpression d'IL-8, MMP-9 et PDGF), qui reflète directement le statut hypoxique de la tumeur (Kucharzewska et al., 2013). En outre, les exosomes « hypoxiques » de cellules gliomateuses sont plus aptes à induire une réponse angiogénique *in vitro* que les exosomes obtenus en condition normoxique. Finalement, les cellules gliomateuses humaines implantées en xénogreffes orthotopiques avec un mélange d'exosomes à statut hypoxique permet d'augmenter la croissance tumorale ainsi que sa vascularisation (Kucharzewska et al., 2013). Ces données suggèrent ainsi que les vésicules sécrétées par les cellules gliomateuses arborent et transmettent un potentiel oncogénique lors du développement tumoral.

De manière intéressante, les avancées technologiques récentes de la microscopie ont permis la caractérisation fine par microscopie à force atomique des exosomes dérivant de deux lignées de glioblastomes (U87 et U251). Ces exosomes arborent de nombreuses extensions latérales (Figure 25), formant des neurofilaments de 10-20 nm d'épaisseur pour plusieurs microns de

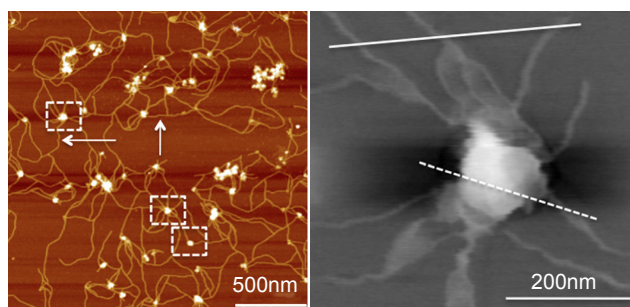


Figure 25. Structure détaillée d'exosomes de cellules gliomateuses. Les exosomes purifiés de U87, observés par microscopie à force atomique, arborent de nombreuses extensions filamenteuses organisées en réseau. (D'après Sharma et al., 2014).

long, résistants au traitement à la trypsine (Sharma et al., 2014). Cette particularité, inconnue jusqu'à lors, n'est pas retrouvée dans les exosomes issus d'astrocytes humains normaux, et permet d'augmenter la fixation des exosomes aux cellules cibles (Sharma et al., 2014). Ainsi ces vésicules pourraient, à la manière d'un biofilm bactérien, créer un véritable réseau autour des cellules cancéreuses du glioblastome, et ainsi augmenter la biodisponibilité de facteurs de croissance ou molécules permettant de modifier le microenvironnement tumoral.

III.3 Vésicules extracellulaires comme marqueur pronostic

Comme mentionné précédemment, les EVs renferment et protègent de nombreux transcrits et protéines pouvant favoriser la croissance tumorale. L'analyse ontologique des vésicules issues de cellules gliomateuses humaines révèle que les ARNm contenus dans ces dernières peuvent affecter, par degré d'importance, la prolifération cellulaire, la suppression immunitaire, la migration cellulaire et l'angiogenèse (Skog et al., 2008). Dans ce sens, des travaux ont permis d'établir une corrélation entre l'expression de miARN, présents dans ces EVs, au pronostic de la maladie. Il apparaît que le profil d'expression de miR-21, dont l'activité oncogénique dans les lymphomes permet d'activer la voie PI3K/AKT (Go et al., 2015), est fortement exprimé dans les vésicules issues du LCR de patients atteints de glioblastome ; à noter qu'il n'y a pas de corrélation dans les EVs du sérum. En outre, le taux de miR-21 vésiculaire chez des patients, trois mois après résection chirurgicale, est quasiment nul dans le LCR (Akers et al., 2013). Il serait donc intéressant de suivre le taux de ce miARN de manière longitudinale, y compris au cours de la récurrence.

Ces études sont prometteuses mais l'analyse des EVs, de manière systématique en clinique, pose un problème technologique lié à la sensibilité des techniques actuelles. Dans ce sens, les travaux de H. Shao et collaborateurs ont conduit au développement d'une puce microfluidique permettant de concentrer et d'analyser le contenu des EVs tout en faisant abstraction des vésicules issues des cellules non cancéreuses (Shao et al., 2012). Cet outil, combiné à la nouvelle technique de polymérisation en chaîne BEAMing (*Beads Emulsion Amplification Magnetics*) PCR permet de réduire et d'optimiser le matériel biologique (Chen et al., 2013; Shao et al., 2015). Par ailleurs, cette dernière méthode a récemment permis de détecter des mutations dans le gène *IDH1* au sein de vésicules purifiées à partir de LCR (Chen et al., 2013). La combinaison de ces deux nouvelles technologies pourrait, à long terme, permettre un meilleur diagnostic, le suivi des patients ainsi qu'une estimation de la réponse au traitement (Shao et al., 2015). Par exemple, les niveaux protéiques en AKT et Erk diminuent chez les patients avec un cancer du poumon à petites cellules, répondant favorablement au Sorafenib, un inhibiteur de kinases, dans des EVs circulantes (van der Mijn et al., 2014).

L'ensemble des études concernant les EVs révèle ainsi des facettes encore inconnues, atypiques, de la communication cellulaire. Une meilleure compréhension de leur biologie, leurs moyens de dissémination, ainsi que leurs mécanismes d'entrée dans les cellules cibles permettraient de mieux lutter contre leurs effets néfastes, voire de les utiliser en tant que thérapie ou biomarqueur.

Ainsi, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et du microendothélium cérébral est déterminée par les interactions cellulaires au sein de l'unité neurovasculaire et l'organisation moléculaire des protéines de jonction. Dans un contexte pathologique, c'est cet équilibre qui est compromis au profit de la tumeur. Non seulement les propriétés des cellules endothéliales tumorales elles-mêmes sont modifiées par des signaux extrinsèques, mais c'est tout leur environnement qui est altéré. En particulier, les cellules endothéliales établissent des contacts privilégiés avec les CSG, responsables de l'initiation, l'agressivité et la récurrence du GBM. Ainsi, cibler la communication entre ces cellules et les cellules endothéliales au sein de la niche périvasculaire apparaissent comme une stratégie thérapeutique innovante. Mon travail de thèse s'est construit autour de l'exploration de la fonction des EVs gliomateuses sur la biologie de l'endothélium cérébral.

Résultats



Sophisme Shadok :

En essayant continuellement on finit par réussir.

Donc plus ça rate et plus l'on a de chances que ça marche.

Chapitre IV Résultats

J'ai effectué mes travaux de thèse, sous la direction du Dr. Julie Gavard, au sein de l'équipe «Biologie Vasculaire dans l'Infection, l'Inflammation et le Cancer» du département Infection Inflammation et Immunité de l'Institut Cochin. Dans le laboratoire, nous développons plusieurs thématiques centrées sur l'étude des mécanismes de signalisation impliqués dans des réponses physiologiques, telles que l'homéostasie vasculaire et lymphocytaire, et le piratage de ces mécanismes en conditions pathologiques. En particulier, comment est modifiée la perméabilité endothéliale dans les pathologies cancéreuses est une question au cœur de nos travaux (Dwyer et al., 2015; Dwyer et al., 2011; Hebda et al., 2013; Le Guelte et al., 2012).

Le glioblastome (GBM) est un modèle pathologique de choix car la vascularisation, et en particulier la perméabilité vasculaire, y occupent une place centrale. En effet, l'endothélium microvasculaire cérébral, qui constitue la barrière hémato-encéphalique (BHE) présente une différenciation unique, caractérisée par des jonctions cellulaires de type étanche et l'expression de nombreux transporteurs, assurant le contrôle vital des échanges entre le sang et le cerveau. L'intégrité de la BHE est souvent altérée au cours de l'évolution de nombreuses maladies du système nerveux central. En particulier, les tumeurs primaires du cerveau ont le taux le plus élevé de prolifération endothéliale parmi les tumeurs solides humaines. De manière à étudier les modulations de la BHE dans le GBM, nous avons exploité un modèle endothélial récapitulant les propriétés de la BHE qui a été développé à l'Institut Cochin par le Dr. P.O. Couraud (Weksler et al., 2005).

Ce modèle a été obtenu par transduction de cellules endothéliales cérébrales humaines avec un vecteur lentiviral exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase humaine hTERT et l'antigène SV40. Ces cellules hCMEC/D3 (*human Cerebral*

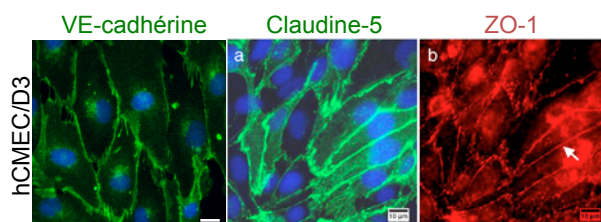


Figure 26. Modèle d'étude de la barrière hémato-encéphalique. Expression de protéines de jonctions endothéliales dans des hCMEC/D3. Barre d'échelle, 10µm. (Panels de droite d'après Luissint et al., 2012).

Microvascular Endothelial Cell) expriment des marqueurs endothéliaux normaux tels que PECAM-1, VE-cadhérine ou von Willebrand factor (Figure 26); et plus spécifiquement de nombreux récepteurs aux chémokines relatifs à l'extravasation des leucocytes à travers la

BHE, ainsi que des protéines d'export de drogues telles que P-gp et MRP-1 (Weksler et al., 2005).

Alors qu'il a longtemps été proposé que l'angiogenèse tumorale participe à l'apport en nutriments et en oxygène nécessaire à la croissance tumorale et donc constitue une cible thérapeutique ; la découverte récente de cellules tumorales à caractère souche (CSG) ou cellules initiatrices de tumeurs suggère en outre l'existence d'une niche vasculaire tumorale (Calabrese et al., 2007).

En effet, les CSG ont été trouvées dans le voisinage direct des cellules endothéliales cérébrales et peuvent contribuer à la formation des vaisseaux sanguins tumoraux (Bao et al., 2006b; Calabrese et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). En collaboration avec l'Hôpital Sainte-Anne à Paris et le Centre de

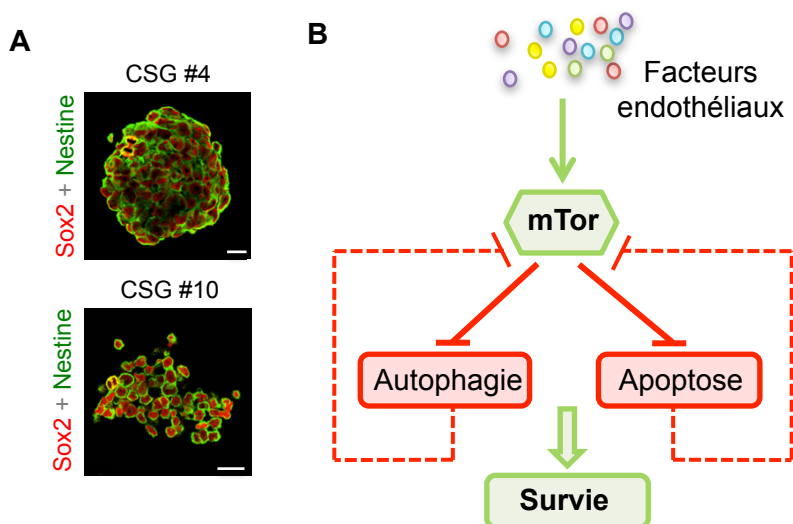


Figure 27. Les cellules souches gliomateuses et leur dépendance aux facteurs endothéliaux. A. Expression de marqueurs de cellules souches neurales dans des CSG en culture sous forme de neurosphère. Barre d'échelle 10µm. B. Représentation de l'importance des facteurs endothéliaux dans la survie des CSG au travers de la voie mTOR. (Pannel B. adapté de Galan-Moya et al., 2014).

Recherche en Cancérologie de Nantes, nous avons obtenu des CSG de biopsies de patients atteints de GBM primaire que nous cultivons *ex vivo* sous forme de neurosphère, et à long terme, dans un milieu défini (Figure 27A). En outre, une collaboration avec le service de Neurologie dirigée par le Dr. D. Ricard à l'Hôpital du Val-de-Grâce, Paris, nous a permis d'accéder à des prélèvements frais de glioblastomes primaires (Tableau 2 cf. page 96).

Dans ce sens, la coculture entre hCMEC/D3 et CSG permet de mimer *in vitro* les interactions cellulaires s'établissant entre l'endothélium et les CSG au sein de la niche vasculaire du GBM. De cette façon, nous avons identifié des facteurs solubles sécrétés par l'endothélium et permettant de contrôler la voie mTOR, essentielle pour la survie ainsi que l'autorenouvellement des CSG (Figure 27B) (Galan-Moya et al., 2011; Galan-Moya et al., 2014).

Vis-à-vis de la communication depuis CSG vers les cellules endothéliales, notre laboratoire a caractérisé *in vitro* le mode d'action pro-perméabilité de la Sémaphorine 3A (Séma3A) sur

l'endothélium cérébral. Cette molécule de guidage agit via les récepteurs Nrp-1/Plxn-A1 pour activer la kinase Src et ainsi lever la protection apportée par la phosphatase PP2A à la VE-cadhérine (Le Guelte et al., 2012). Cette dernière est alors phosphorylée et internalisée, les jonctions cellule-cellule endothéliales affaiblies et la perméabilité augmentée (Figure 28). Durant mes études en master, j'ai eu l'opportunité de participer à cet article qui a posé les bases de mon projet de thèse. J'ai également pu contribuer à la rédaction de trois revues autour des Sémaphorines et des processus impliquant la vascularisation tumorale.

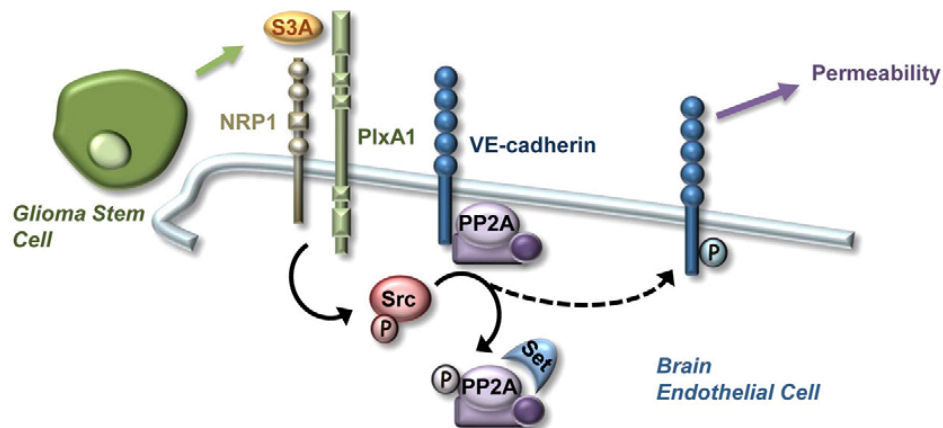


Figure 28. Mécanisme d'internalisation de la VE-cadhérine sous l'effet de la Séma3A sécrétée par les cellules souches gliomateuses. Au travers des récepteurs Nrp-1 et Plxn-A1, et l'activation de Src, la Séma3A conduit à la phosphorylation et la déstabilisation de la phosphatase PP2A. La VE-cadhérine est alors sujette à phosphorylation sur le résidu sérine S665 conduisant à son internalisation et à une élévation de la perméabilité endothéliale. (D'après Le Guelte et al., 2012).

Article de thèse

Extracellular vesicle-transported Semaphorin3A promotes vascular permeability in glioblastoma

Lucas Treps, Sébastien Edmond, Elizabeth Harford-Wright, Eva Maria Galan-Moya, Alain Schmitt, Sandy Azzi, Antoine Citerne, Nicolas Bidère, Damien Ricard et Julie Gavard.

En révision à Oncogene (MS # ONC-2015-00600 et MS # ONC-2015-00600R)

Le GBM est une tumeur cérébrale agressive dont le pronostic est sombre et la récurrence quasi inévitable (Yan et al., 2013). Comme décrit pour plusieurs autres cancers, une sous-population de cellules tumorales à caractère souche est cruciale pour l'initiation et la récurrence du GBM (Singh et al., 2003; Yuan et al., 2004). Au sein de la niche vasculaire, les CSG sécrètent de nombreux facteurs permettant d'augmenter la perméabilité vasculaire, contribuant à l'angiogenèse et à la formation d'œdèmes. Parmi les facteurs sécrétés, la molécule de guidage Séma3A a été identifiée et caractérisée pour son action anti-angiogénique et pro-perméabilité (Acevedo et al., 2008; Casazza et al., 2011; Le Guelte et al., 2012; Maione et al., 2009). Cette protéine induit une augmentation de la perméabilité via le corécepteur Nrp-1 porté par les cellules endothéliales, mais également au travers d'autres mécanismes indépendants de Nrp-1 (Casazza et al., 2013; Hou et al., 2015; Le Guelte et al., 2012).

Dans cette étude nous décrivons que les CSG relâchent dans le milieu des vésicules extracellulaires (EV), qui sont une population mixte de vésicules (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques), dont l'implication dans la communication cellulaire est maintenant démontrée (Colombo et al., 2014; Costa-Silva et al., 2015; Kucharzewska et al., 2013; Skog et al.,

2008; Valadi et al., 2007). Ces EV contiennent la Séma3A, exprimée à leur surface (Figure 29). En outre, l'action pro-perméabilité de la Séma3A recombinante ou du milieu conditionné des CSG est récapitulée *in vitro* par ces vésicules, mais fortement diminuée lorsque l'expression de la Séma3A est réduite dans les CSG par ARN interférent. Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'expression de la Nrp-1 est abrogée par ARN interférent dans

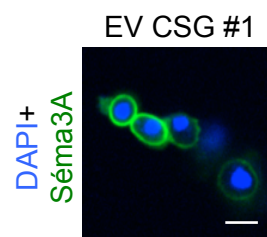


Figure 29. Microscopie confocale de vésicules extracellulaires purifiées de cellules souches gliomateuses. DAPI marque les acides nucléiques présents. Barre d'échelle, 500 nm.

les cellules endothéliales. Puisque la Nrp-1 peut à la fois contrôler les réponses à la Séma3A et au VEGF, nous avons employé à notre avantage des anticorps humanisés, développés par Genentech, et ciblant spécifiquement la liaison de Séma3A ou VEGF à la Nrp-1 (Pan et al., 2007). Ces outils pharmacologiques nous ont permis de montrer que l'effet des EV sur la perméabilité endothéliale, est dépendant de l'axe Séma3A/Nrp-1 et indépendant de VEGF/Nrp-1.

L'étape suivante a été d'étudier *in vivo*, l'effet spécifique de la Séma3A au sein de cette fraction vésiculaire. Le modèle du Miles assay a été employé durant lequel des souris sont injectées de façon systémique avec du Bleu

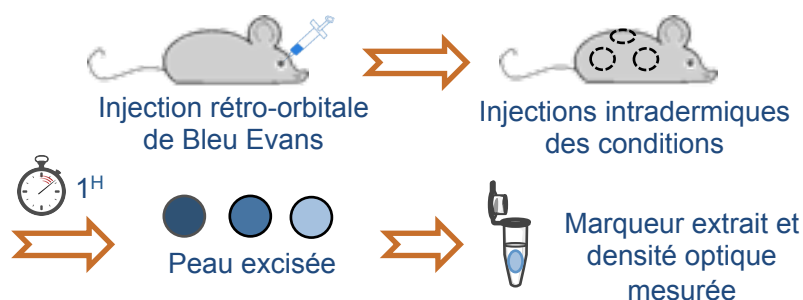


Figure 30. Etude de la perméabilité vasculaire par Miles assay. Après injection systémique de Bleu Evans, les vésicules extracellulaires sont injectées en intradermiques dans des zones préalablement délimitées. Au bout d'1h, les animaux sont sacrifiés, la peau excisée et le colorant extrait.

Evans. Après circulation du colorant, les conditions à tester sont injectées en intradermique et l'extravasation de Bleu, mesurée par densité optique, reflète l'effet sur la perméabilité vasculaire des vaisseaux de l'épiderme (Figure 30). Nous avons également développé un modèle *in vivo* original afin de mesurer la perméabilité vasculaire des microvaisseaux cérébraux. Des souris profondément anesthésiées sont injectées avec le Bleu Evans par voie systémique, puis une craniotomie est réalisée sur un hémisphère afin d'enlever la couche osseuse protégeant les méninges. Les conditions testées sont ensuite déposée sous forme de goutte à la surface du cerveau exposé, puis l'animal est euthanasié et le cerveau extrait pour étude immunohistochimique (Figure 31). Par utilisation d'ARN interférent ciblant Séma3A

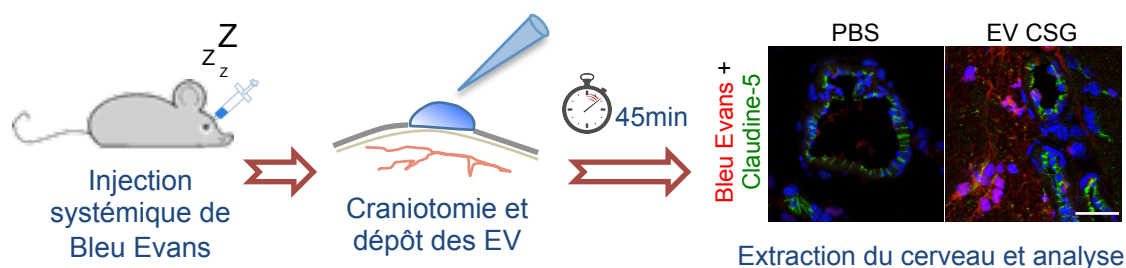


Figure 31. Etude de la perméabilité vasculaire cérébrale par microcirculation *in situ*. L'injection systémique de Bleu Evans est suivie d'une craniotomie de l'hémisphère gauche. Cette fenêtre permet un dépôt des vésicules extracellulaires (EV) issues de CSG, ou une solution saline contrôle (PBS) agissant pendant 45 min. Les animaux sont ensuite sacrifiés, le cerveau est extrait et l'extravasation de Bleu (rouge) autour des vaisseaux (Claudine-5) analysée par immunomarquage. Barre d'échelle, 30 μ m.

dans les CSG, ces deux modèles *in vivo* nous ont permis de valider le rôle puissant de cette protéine au regard de l'effet pro-perméabilité des EV de CSG. D'autre part, étant donné que nos résultats suggèrent que les EV sont capables de circuler d'un hémisphère à l'autre, et que des données de la littérature ont documenté la présence de EV circulantes dans le sang périphérique, nous avons voulu tester cette hypothèse dans nos modèles animaux. Pour cela nous nous sommes appuyés sur deux modèles de développement tumoral de CSG. Concernant les xénogreffes ectopiques, 1.10^6 CSG sont injectées, avec un mélange de Matrigel et PBS, en sous-cutané dans les deux flancs de souris BALB/c nude. Vis-à-vis des xénogreffes intracrâniennes l'injection de 1.10^5 CSG s'est effectuée dans le striatum droit à l'aide d'une seringue Hamilton. Respectivement après cinq et onze semaines de développement tumoral, le sang circulant est collecté et les EV isolées. De façon intéressante le taux de Séma3A dans cette fraction de EV est significativement augmenté dans nos deux modèles de xénogreffes de CSG.

Tableau 2. Caractéristiques des patients étudiés et diagnostiqués glioblastome primaire

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age	47	67	84	84
Taille de la tumeur au diagnostic (mm)	33	45x38	40	20x20
Statut moléculaire	IDH1-P53-Fgfr3 ⁻	IDH1-P53-Fgfr3 ⁻	IDH1*P53 ⁺ Fgfr3 ⁻	IDH1-P53 ⁺ Fgfr3 ^w
Localisation	fronto-pariétal droit	pariéto-occipital gauche	pariétal gauche	intra-axial gauche
Symptômes	hémiparésie gauche	aphasie de Broca	déficit mnésique, épilepsie	syndrome dysexécutif

^w Faiblement exprimé

De la même façon, les EV issues du sang circulant de patients contiennent des taux élevés de Séma3A (Tableau 2 et Figure 32), capables d'induire une fuite vasculaire dans les capillaires cérébraux de façon dépendante de la voie de signalisation Séma3A/Nrp-1 mais indépendante de VEGF/Nrp-1.

Bien que les thérapies anti-VEGF aient été décrites comme aptes à diminuer la vascularisation tumorale, et donc la survie des CSG au sein de la niche vasculaire (Batchelor et al., 2007; Calabrese et al., 2007), ces approches demeurent largement inefficaces en clinique et soumises à débat (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). De part sa fonction double, en tant que facteur anti-angiogénique et pro-perméabilité autour du corécepteur Nrp-1, partagé par le VEGF, la Séma3A représenterait une cible alternative intéressante pour des thérapies visant à réduire la vascularisation tumorale. De plus, plusieurs études récentes mettent en avant le potentiel des EV en tant que biomarqueur afin d'évaluer indirectement, et de façon peu

invasive, les propriétés tumorales. De façon intéressante, le contenu protéique et nucléique de ces EV est modulé en fonction du microenvironnement tumoral (*i.e.* hypoxie) et affectant de fait la tumorigenèse (Kucharzewska et al., 2013). Ainsi, notre étude suggère que la Séma3A, transportée dans la fraction de EV, pourrait être utilisée en tant que biomarqueur thérapeutique, ou de réponse aux thérapies conventionnelles.

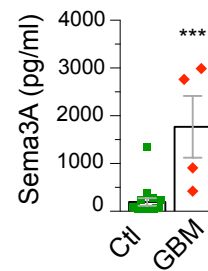


Figure 32. Augmentation de l'expression de la Séma3A dans les patients glioblastome. Le taux de Séma3A est quantifié par ELISA dans les vésicules purifiées du sang circulant de donneurs sains (Ctl, n=15) ou de patients diagnostiqués glioblastome (GBM, n=4). *** $p < 0.001$.

Extracellular vesicle-transported Semaphorin3A promotes vascular permeability in glioblastoma

Lucas Treps^{1,2,3}, Sébastien Edmond⁴, Elizabeth Harford-Wright^{1,2,3}, Eva-Maria Galan-Moya^{1,2,3}, Alain Schmitt^{1,2,3}, Sandy Azzi^{1,2,3}, Antoine Citerne^{1,2,3}, Nicolas Bidère^{1,2,3}, Damien Ricard^{4,5}, Julie Gavard^{1,2,3}

Glioblastoma are malignant highly vascularized brain tumours, which feature large oedema resulting from tumour-promoted vascular leakage. The pro-permeability factor Semaphorin3A (Sema3A) produced within glioblastoma has been linked to the loss of endothelial barrier integrity. Here, we report that extracellular vesicles (EVs) released by patient-derived glioblastoma cells disrupt the endothelial barrier. EVs expressed Sema3A at their surface, which accounted for in vitro elevation of brain endothelial permeability and in vivo vascular permeability, in both skin and brain vasculature. Blocking Sema3A or its receptor Neuropilin1 (NRP1) hampered EVs-mediated permeability. In vivo models using ectopically and orthotopically xenografted mice revealed that Sema3A-containing EVs were efficiently detected in the blood stream. In keeping with this idea, sera from GBM patients also contain high levels of Sema3A carried in the EV fraction that enhanced vascular permeability, in a Sema3A/NRP1-dependent manner. Our results suggest that EV-delivered Sema3A orchestrates loss of barrier integrity in glioblastoma and may be of interest for prognostic purposes.

Keywords: brain tumour, endothelial barrier, neuropilin, semaphorin, exosome, microvesicles.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) are the most common primary brain tumours in adults. Despite surgery followed by concurrent radio-/chemo-therapies, relapse is almost inevitable and the median survival ranges between 15 to 18 months.¹ As described for other cancers, GBM contain a subpopulation of rare, self-renewing cancer cells, named glioblastoma stem-like cells (GSCs) that sustain the malignant properties of the tumours, including initiation, resistance to treatments and recurrence.² GSCs accumulate in a specific defined microenvironment where they closely interact and exchange factors with brain endothelial cells.³⁻⁵ While endothelial-emitted soluble factors were proposed to supervise the fate and survival of GSCs,³⁻⁵

how in turn GSCs impact on endothelial plasticity remains inadequately addressed. GBM are highly vascularized tumours associated with enhanced vascular permeability, which can then contribute to angiogenesis and oedema. Although anti-angiogenic drugs targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling were reported to diminish GSC survival and tumour vascularization, anti-VEGF strategies remain a matter of debate in the context of GBM treatment.⁵⁻⁸ The guidance molecule Semaphorin3A (Sema3A) secreted by GSCs is another pro-permeability factor with ambiguous functions reported in tumour angiogenesis, acting as pro-permeability but anti-angiogenic.⁹⁻¹² Sema3A can trigger endothelial permeability via its receptor Neuropilin 1

1 Cnrs, UMR8104, 22 rue Mechain, Paris 75014, France

2 Inserm, U1016, 22 rue Mechain, Paris 75014, France

3 Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 12 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France

4 Hôpital d'Instruction des Armées du Val-de-Grâce, service de neurologie, 75230 Paris cedex, France.

5 Cnrs, UMR8257 COGNAC G, 74 Bd de Port-Royal, Paris 75005, France.

(NRP1), although some NRP1-independent mechanisms have been recently uncovered in a different cellular background.^{9, 12, 13} However, it still remains unclear how *Sema3A* emanating from GSCs might predispose to these vascular defects.

In this study, we investigated the role of GSC-released extracellular vesicles (EVs), which encompass exosomes, microvesicles and apoptotic bodies.¹⁴ EVs were indeed shown to convey molecular information and signalling cues within the tumour microenvironment and beyond, as they efficiently travel throughout the organism and can be detected in various organic fluids and secretions.¹⁴⁻¹⁸ We discovered that patient-derived GSC-released EVs increase brain vascular leakage through the *Sema3A*/NRP1 signalling node. Importantly, circulating GSC-derived EV *Sema3A* levels were upregulated in ectopic and orthotopic xenografted mouse models. Finally, EVs isolated from GBM patient sera exhibit elevated *Sema3A* concentration and Semaphorin3A/NRP1-dependent but VEGF/NRP1-independent permeability potential. Thus, our data suggest a crucial role for EV-delivered *Sema3A* in GBM vascular defects.

RESULTS

GSC-released EVs induce endothelial permeability

Since the early discovery of exosomes in reticulocytes, a large palette of cell types, including cancer cells have been shown to release EVs that contribute to cell communication.^{15, 16} Given that endothelial cells are close neighbours of glioblastoma stem-like cells (GSCs) in the tumour microenvironment,^{3-5, 9, 19} we first investigated the impact of patient-derived GSC EVs on brain endothelial cells. EVs isolated from GSC conditioned media through sequential ultracentrifugation steps (Supplementary Figure S1) were first examined by electron microscopy. This showed that EVs exhibited two different populations that encompassed both

exosomes, with typical size ranging from 30 to 100 nm (Figure 1a, left), and a side population of larger diameter, which likely corresponds to microvesicles (Figure 1a, right). Additionally, biochemical analyses revealed the presence of classical EV markers, such as CD63, CD9, Hsp70, or Rab4 (Supplementary Figure S2a).^{14, 15} By contrast, the absence of the early endosome antigen EEA-1, as well as of the mitochondrial import receptor subunit Tom20 or the endoplasmic reticulum resident protein Kinectin argued against a contamination of EV pellets with apoptotic and cell debris (Supplementary Figures S2a-b). Consistent with the ability of EVs to carry and preserve nucleic acids from extracellular degradation,^{15, 16} EV-supplied mRNAs were resistant to RNase treatment, unless SDS was used to destabilize lipid membranes (Supplementary Figure S2c). Lastly, EV pellets secreted by human GSC were re-suspended in 0.22 μ m-filtered vehicle (PBS or medium), in order to prevent from exogenous contamination. Flow cytometry analysis of Annexin V and CD63 staining profiles revealed the presence of distinct populations of EVs in patient-derived GSCs (#1 and #4) conditioned media (Figure 1b-c). EVs were positive for CD63, which is typically enriched in the exosome fraction, yet a significant portion of EVs was stained either with Annexin V alone or in combination with CD63 (Figure 1b). Thus, EV pellets most likely contain both exosomes and microvesicles.

In order to explore whether EVs can convey information to endothelial cells, lipophilic fluorescent dye PKH-67 was used to label GSC-derived EVs. Living human cerebral microvascular endothelial cells were then incubated with these PKH-67 labelled-EVs. EVs were rapidly internalized in endosome-like structures accumulating around the nucleus (Figure 1d). As evaluated by flow cytometry, this active uptake process that occurs at 37°C was interrupted when endothelial cells were incubated at 4°C, a

temperature that hinders receptor-mediated endocytosis (Figure 1e). From a functional standpoint, EV uptake in endothelial cells led to a dramatic reorganization of the cell-cell adhesion molecule VE-cadherin (Figure 1f). Consistent with the pivotal role of VE-cadherin in maintaining endothelial junction integrity and barrier function,^{9, 20} EVs isolated from three different GSCs, while not from non tumour epithelial HEK293T cells, induced a significant 2.48 fold mean increase in permeability, as measured by

the passage of FITC-labelled 40 kDa dextran (Figure 1g). Furthermore, Evans blue dye extravasation (Miles assay) experiments confirmed this observation *in vivo*.⁹ GSC-isolated EVs indeed lead to a significant 2.3 fold increase of Evans blue extravasation in skin, as compared to PBS-injected conditions (Figure 1h). Again, HEK293T cell-derived EVs were not able to heighten vascular permeability (Figures 1g-h). Thus, our data provide compelling evidence that patient-derived GSC-produced EVs can be taken up by endothelial cells, and in turn

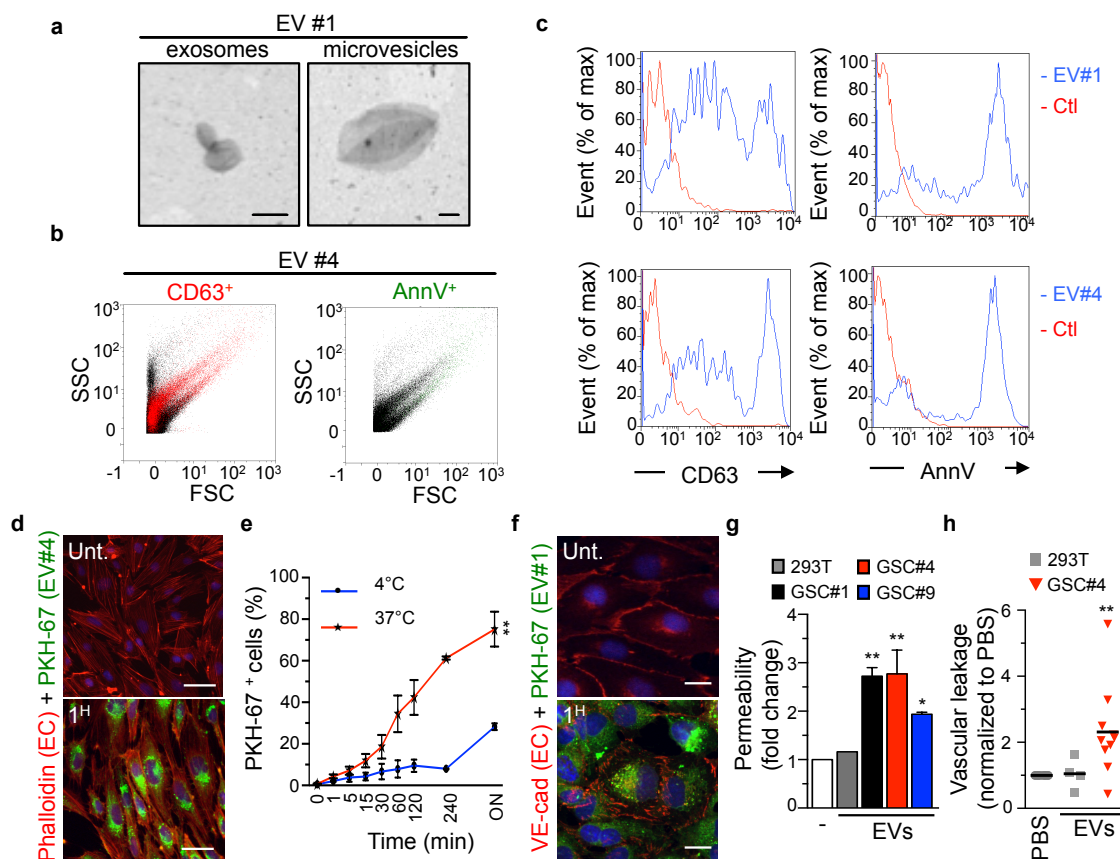


Figure 1. GSC-released extracellular vesicles induce endothelial permeability. (a) Electronic microscopy analysis of purified GSC#1-shed EVs. Smaller (50-100 nm exosomes) and larger vesicles (microvesicles) are displayed. Scale bar: 100 nm. (b) Representative FSC/SSC dot-plot of the GSC#4-EV population analysed with the MACSQuant Analyser for the expression of CD63 (red, exosomes) and Annexin V (AnnV, green, microvesicles). (c) Flow cytometry analysis of CD63 (blue) and Annexin V (AnnV, blue) expression on purified EVs secreted from GSC#1 (top) and GSC#4 (bottom). As negative controls PE-conjugated control isotype was used for CD63, and 1X Annexin V Buffer alone without dye for Annexin V (Ctl, red). (d) Confocal analysis of phalloidin-stained brain endothelial cells (ECs) stimulated for 1h at 37°C, 5% CO₂ with PKH-67-labeled purified GSC#4-shed EVs (EV#4) or treated with PKH-67 wash (Unt.) described in Material and Methods. Scale bar: 40 µm. (e) Flow cytometry analysis of PKH-67-positive ECs treated as in (d), either at 37°C or 4°C in order to hamper active endocytosis, for the indicated times. **, p<0.01. (f) Confocal analysis of VE-cadherin (VE-cad, red) staining in control ECs (Unt.) or challenged for 1h with PKH-67-labeled purified GSC#1-shed EVs (green). Nucleic acid staining is shown in blue (DAPI). Scale bar: 20 µm. (g) Permeability was measured in ECs exposed to purified EVs from HEK293T, GSC#1, GSC#4 and GSC#9. Results are expressed as fold change to untreated conditions (-). *, p<0.05; **, p<0.01. (h) Evans blue dye extravasation (Miles assay) of intradermic injected mice with saline control (PBS) and purified EVs from HEK293T and GSC#4 (n≥6). Values are expressed as fold change to PBS-injected samples. **, p<0.01. Each panel is representative of at least three independent experiments.

promote vascular permeability.

EV-transported Sema3A enhances vascular permeability through NRP1

We previously demonstrated that the guidance molecule Semaphorin 3A (Sema3A), released by GSCs within the

extracellular milieu, could increase vascular permeability.⁹ In line with this, the vast majority of patient-derived GSCs that have been tested expressed SEMA3A (Supplementary Figure S3a). This feature may be a hallmark of the GSC population, as cells cultured in adherent conditions that

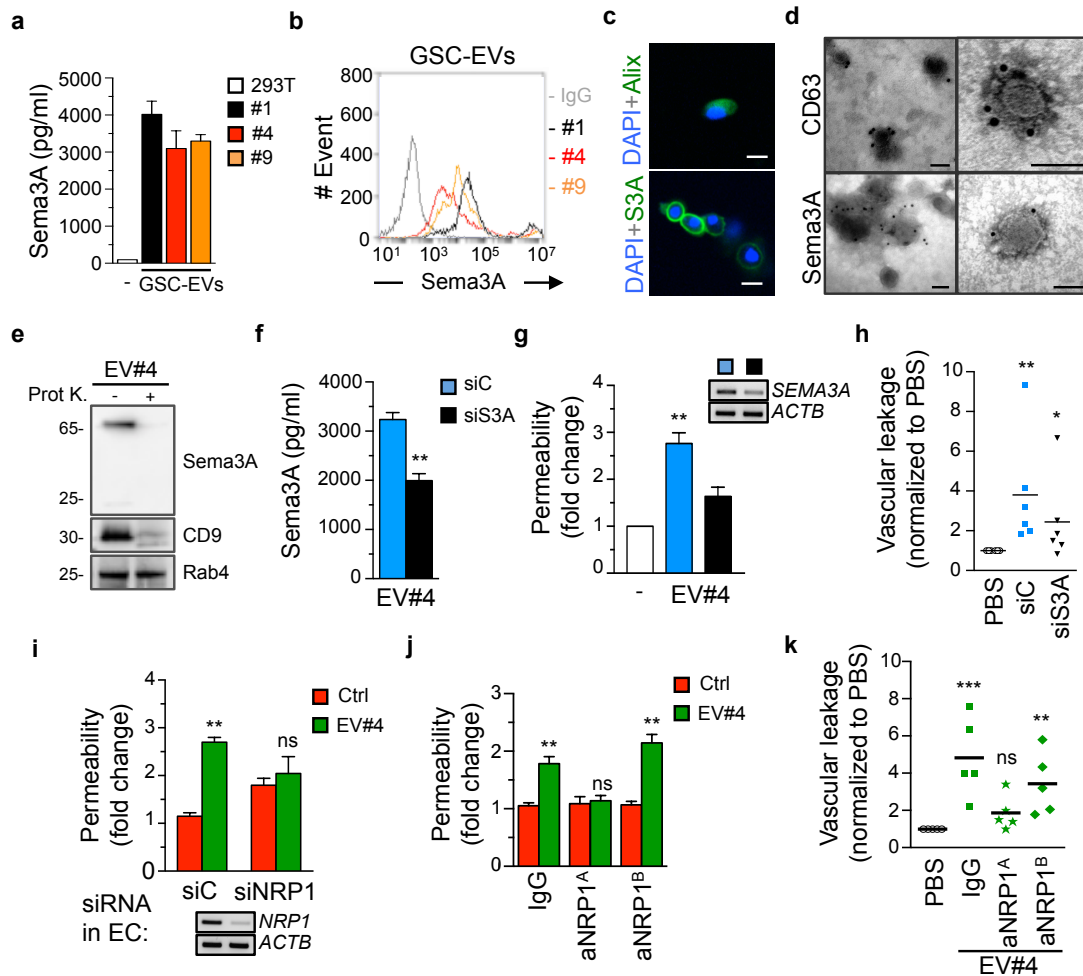


Figure 2. EV-transported Sema3A enhances vascular permeability through NRP1. (a) Sema3A concentrations were measured by ELISA in purified EVs from HEK293T, GSC#1, #4 and #9. (b) Flow cytometry analysis of Sema3A surface expression in purified EVs from GSC#1, #4 and #9. PE conjugated isotype control (IgG) is shown in grey. (c) Confocal analysis of purified GSC#1-shed EVs stained with Alix (green) and Sema3A (S3A, green). Nucleic acid staining is shown in blue (DAPI). Scale bar: 500 nm. (d) Electronic microscopy analysis of purified GSC#4-secreted EVs stained by immunogold for CD63 and Sema3A. Scale bars: 50 nm. (e) Western-blot analysis for Sema3A, CD9 and Rab4 in purified GSC#4-secreted EVs (EV#4) either untreated (-) or subjected to proteinase K treatment (Prot K, +). (f) EVs were purified from conditioned medium of GSC#4 that received either non-silencing RNA (siC, blue bar) or siRNA targeting Sema3A (siS3A, black bar). Sema3A concentrations were measured by ELISA. **, $p < 0.01$. (g-h) EVs as prepared in (f) were administered to measure endothelial permeability (g) in vitro and (h) in vivo ($n = 6$). Results are expressed as fold change to untreated conditions (- and PBS, respectively). Insert panel shows RT-PCR for Sema3A and Actin (ACTB) in GSC#4. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. (i) Permeability assays were performed in non-silencing (siC) or siRNA targeting NRP1 (siNRP1)-transfected endothelial cells (ECs). Two days after transfection ECs were treated with purified GSC#4-secreted EVs (EV#4, green) or control vehicle (Ctrl, red). Insert panel shows RT-PCR for Neuropilin (NRP1) and Actin (ACTB), to assess siNRP1 efficiency in ECs. **, $p < 0.01$. (j) ECs were pre-treated with blocking antibodies (25mg/ml) preventing Sema3A- (aNRP1A) or VEGF-A- (aNRP1B) binding to NRP1 receptor. Human immunoglobulins (IgG) were used as control with the same concentration as blocking antibodies. ECs were then exposed to purified GSC#4-shed EVs. **, $p < 0.01$. (k) Mice received intradermic injections of blocking (175mg/ml) and control antibodies (IgG) together with purified GSC#4-secreted EVs. Vascular permeability was measured using in vivo Miles assay ($n = 5$). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Each panel is representative of at least three independent experiments.

trigger their differentiation,³ expressed dramatically less SEMA3A transcript, along with the reduction of the stemness markers Sox2 and Nestin (Supplementary Figure S3b). Importantly, ELISA assays revealed the presence of Sema3A within GSC-purified EVs with an average concentration of 3.47 ng/ml, while expressed in neither HEK293T-EVs nor adherent differentiated GSCs (Figure 2a and Supplemental Figure 3c). Moreover, Sema3A was detected at the surface of EVs by flow cytometry and confocal microscopy (Figures 2b-c).

Immunogold electronic microscopy analyses further indicate that Sema3A may accumulate at the membrane of EVs, along with the exosomal transmembrane protein CD63 (Figure 2d). In addition, a treatment of EVs with the broad substrate specificity endopeptidase proteinase K efficiently trimmed full length Sema3A similarly to the multipass membrane protein CD9, while sparing the internal Rab4, further supporting the idea that Sema3A locates on the exposed part of EVs (Figure 2e). To unravel whether EV -delivered Sema3A

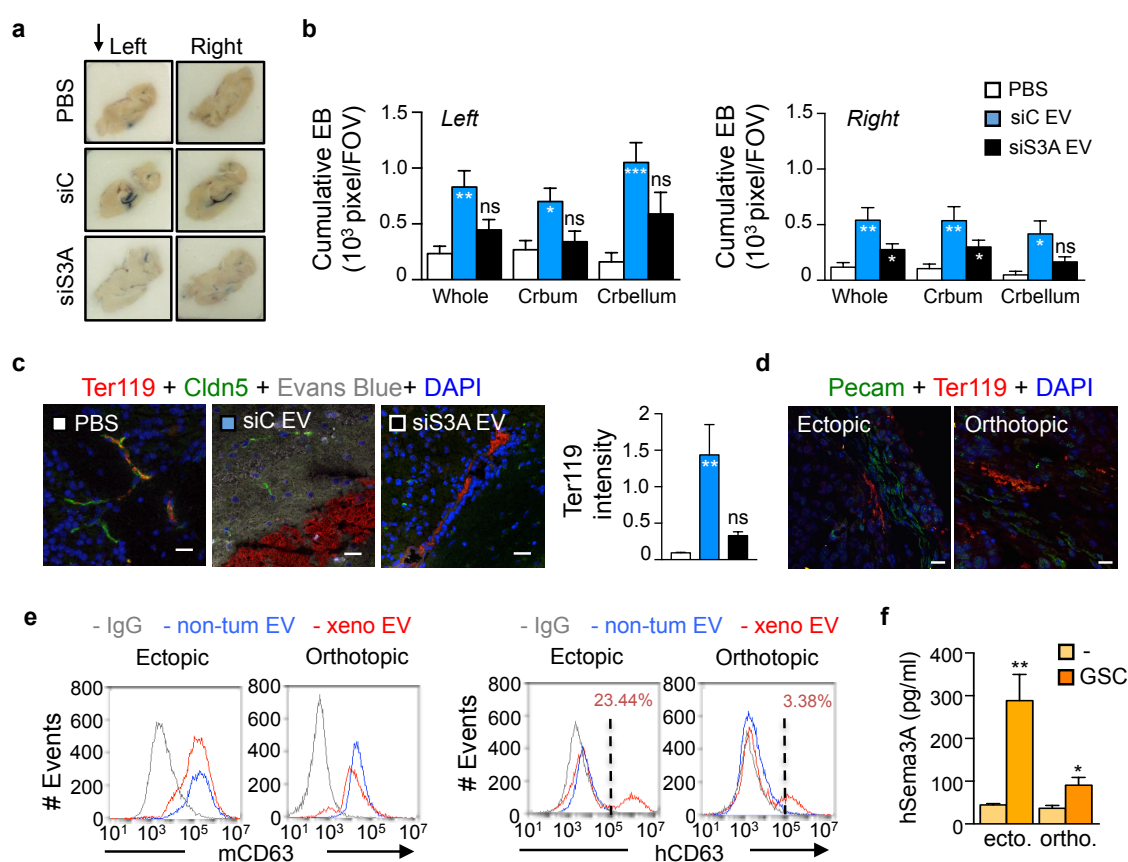


Figure 3. Tumour-derived EV-transported Sema3A enhances vascular permeability. (a-c) EVs were purified from conditioned medium of GSC#4 that received either non-silencing RNA (siC) or Sema3A-targeting (siS3A), and applied to the left hemisphere of mouse brain. Vehicle (PBS) served as control. (a) Evans blue extravasation is shown in OCT-included brains. Arrow indicated the site of EV dropping (left hemisphere). (b) Intensity of Evans blue extravasation was quantified in left and right hemispheres, including all brain areas (whole), only cerebrum (crbum), or cerebellum (crbellum). *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. (c) Confocal analysis of the red blood cell marker Ter119 (red), Claudin5 (Cldn5, green) and Evans Blue (grey) in frozen brain sections. Nucleic acid staining is shown in blue (DAPI). Scale bar: 40 μ m. Graph show the quantification of Ter119 signal intensity from confocal analysis. **, p<0.01. (d) Frozen tissue sections from sub-cutaneous ectopic and intracranial orthotopic GSC#9 xenografts were stained with Pecam (green) and Ter119 (red). Nucleic acid staining is shown in blue (DAPI). Scale bar: 20 μ m. (e) Circulating blood EVs were purified from non-injected (non-tum EV, blue) and GSC-xenografted (xeno EV, red) mice and were analysed by flow cytometry for mouse (m) and human (h) CD63. Respective isotype controls (IgG) are shown in grey. Percentage represents the number of positive events for hCD63. (f) Human Sema3A (hSema3A) concentrations were measured by ELISA in circulating EVs purified from sera of non-injected (-, light orange) and ectopically (ecto.) or orthotopically (ortho.) GSC xenografted (GSC, orange) mice. *, p<0.05; **, p<0.01. Each panel is representative of at least three independent experiments.

could contribute to permeability increase, *Sema3A* expression was silenced in GSCs by RNA interference, and *Sema3A*-depleted EVs were isolated from the conditioned media (Figure 2f).

Although *Sema3A* depletion did not affect EV uptake in endothelial cells (Supplementary Figure S4) nor EV number (data not shown), endothelial permeability was significantly reduced both in vitro and in vivo (Figures 2g-h). In line with this, EVs prepared from adherent differentiated GSCs, which do not expressed *Sema3A* were not able to trigger permeability in vitro and in vivo (Supplementary Figures S3d-e). Interestingly, exosomes discriminated from microvesicles according to recently established protocols (Supplementary Figure 1)²¹ were found to be preferentially enriched in *Sema3A* and to bear the pro-permeability action of the EV population (Supplementary Figure S3f-g). Overall, our results suggest that exosome-transported *Sema3A* within GSC-emanating EVs significantly contributes to the pro-permeability effects of GSC-released factors.

Since Neuropilin 1 (NRP1) propagates *Sema3A* actions in endothelial cells,^{9, 12} we next explored its impact on EV-mediated permeability. Paralleling *Sema3A* silencing, knock down of NRP1 in recipient endothelial cells did not alter EV delivery (Supplementary Figure S4). However, GSC-secreted EVs no longer enhanced endothelial permeability without NRP1 (Figure 2i). Because NRP1 serves as co-receptor for vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) as well,²² we took advantage of engineered human antibodies that specifically block the binding to NRP1 of either *Sema3A* or VEGF-A, named hereinafter as aNRP1A and aNRP1B,

respectively.²³ While pre-treatment with either human control or aNRP1B antibodies did not affect basal and EV-induced permeability increase, aNRP1A blocking antibodies abrogated EV actions (Figure 2j). Significant reduction of EV-promoted vascular leakage was also observed in vivo (Figure 2k). Collectively, our data suggest that EV-delivered *Sema3A* increased vascular permeability through its receptor NRP1 harboured by the endothelial target cells.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age	47	67	84	84
Gender	m	m	m	m
Diagnosis	I ^{ary} GBM	I ^{ary} GBM	I ^{ary} GBM	I ^{ary} GBM
Tumour size at diagnosis (mm)	33	45x38	40	20x20
Molecular status	IDH1 ⁻ P53 ⁺ Fgfr3 ⁺	IDH1 ⁻ P53 ⁺ Fgfr3 ⁺	IDH1 ⁺ P53 ⁺ Fgfr3 ⁻	IDH1 ⁻ P53 ⁺ Fgfr3 ^W
Localization	right fronto-parietal	left parieto-occipital	left parietal	left intra-axial
Symptoms	left hemiparesia	Broca's aphasia	Mnesic deficit, epilepsy	Dysexecutive syndrom
Oedema	significant perilesion oedema	ns	increased rCBV	significant perilesion oedema
Vascularization	no neoangiogenesis	ns	significant neo-angiogenesis (5-7 factor)	ns

Table 1. Clinical data of newly diagnosed glioblastoma patients.

Blood samples from newly diagnosed GBM patients were processed for extracellular vesicle collection.

ns : not specified

^W : weakly expressed marker

Tumour-derived EV-transported *Sema3A* enhances vascular permeability

We next developed a new in vivo approach to directly assess the effects of EVs on the barrier function of brain microvessels. To this end, animals were first systemically injected with Evans blue, a dye that is typically precluded from entering the brain parenchyma by the blood brain barrier (BBB). A craniotomy performed on the left hemisphere allowed application of tested conditions directly on meninges, onto the intact dura mater. Strikingly, brains treated with GSC-derived EVs displayed a massive Evans blue extravasation, which also reached the non-exposed contralateral hemisphere (Figure 3a). In addition, a small

but significant amount of GSC-emanated EVs was recovered from peripheral blood, underscoring the ability of EVs to circulate throughout the body (Supplementary Figure S5). The role of *Sema3A* on the leakage in cerebrum and cerebellum was further investigated for both hemispheres. We

observed that vascular permeability was significantly and potently elevated upon GSC-derived EV exposure, and that *Sema3A* depletion quelled this effect in both hemispheres (Figure 3b). Furthermore, Ter119 staining that labelled red blood cells revealed large haemorrhagic areas co-

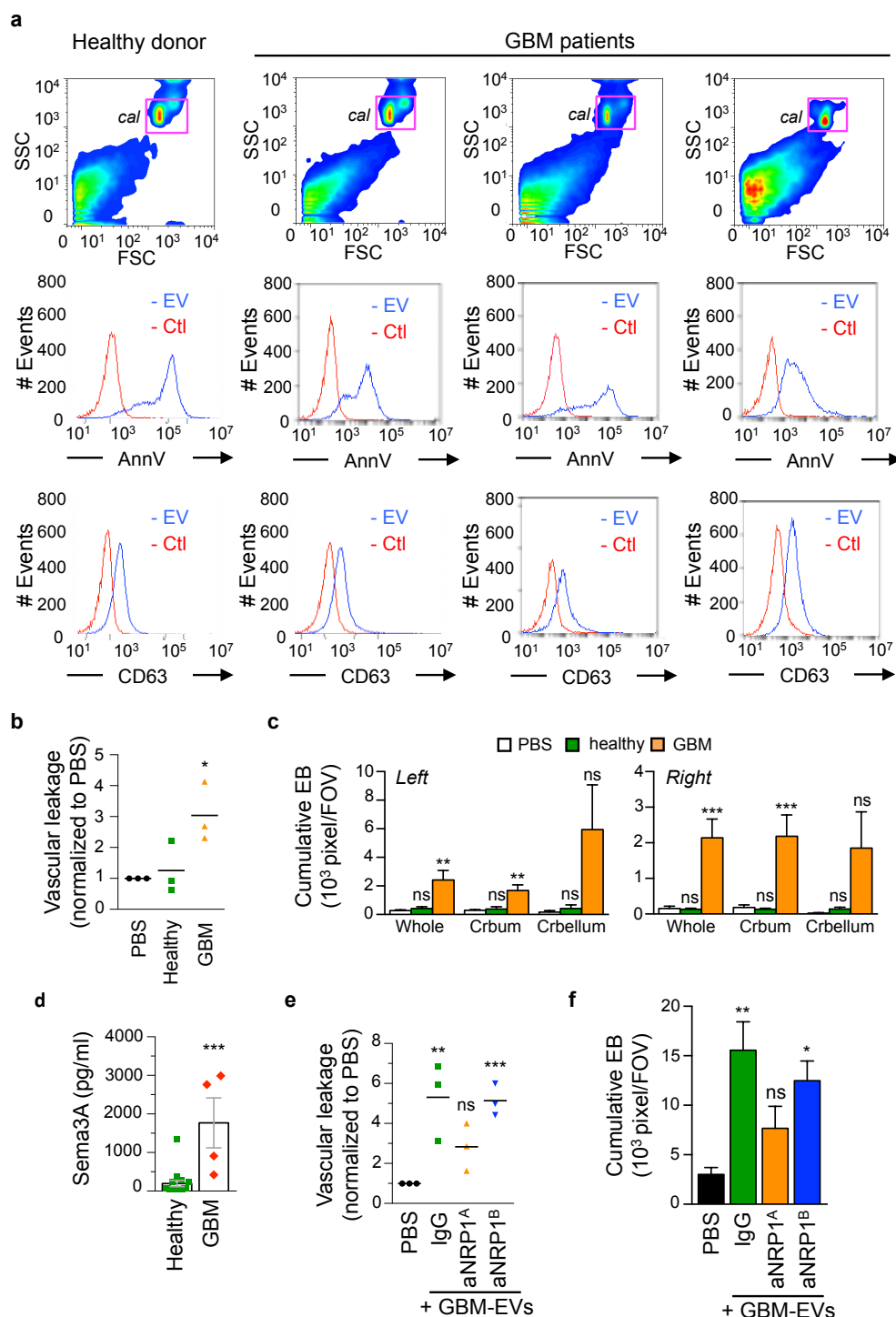


Figure 4. Peripheral blood-isolated EVs from glioblastoma patients promote vascular permeability through a *Sema3A*/NRP1-dependent mechanism. Circulating EVs were purified from healthy donor and GBM patient sera. **(a)** Representative FSC/SSC dot-plot of the EV population, re-suspended in filtered-PBS, and analysed by flow cytometry together with 10 μ m-calibrated beads (cal). EVs were further analysed by flow cytometry for Annexin V (AnnV, blue) and CD63 (blue) relative to their respective controls (Ctl, red). **(b)** Evans blue dye extravasation (Miles assay) of

stained with Evans blue signal (Figure 3c), absent in PBS-treated control mice. Again, this phenotype was strongly reduced in the absence of *Sema3A* (Figure 3c).

To explore whether the diffusion of EVs throughout brain circulation could also occur in the tumour microenvironment, both sub-cutaneous ectopic and intracranial orthotopic GSC-xenografted mouse models were engineered. As expected, tumours exhibited a high vascularization index, as illustrated by PECAM staining, along with Ter119-positive cell extravasation in favour of vascular permeability defects (Figure 3d). EVs were purified from peripheral blood of healthy mice and tumour-bearing mice, 11 and 5 weeks post-implantation in flank and striatum, respectively, and analysed by flow cytometry using either anti-human (h) or anti-mouse (m) CD63 antibodies. The absence of cross-reactivity inter-species was first confirmed by flow cytometry (Supplementary Figure S6). While number of mCD63-positive EVs remained constant in tumour-free and xenografted mice, a fraction of hCD63-positive EVs was detected in xenografted mice (23.44% in the context of ectopic tumours, and 3.38% in orthotopic ones), suggesting that this fraction of human EVs arose directly from implanted GSCs (Figure 3e). Lastly, ELISA assays revealed that EVs isolated from the peripheral blood of xenografted mice contain a significant amount of human *Sema3A*, as compared to tumour-free mice (288.5 versus 41.99 pg/ml in the ectopic models and 90.77 versus 36.88 pg/ml in the orthotopic ones)(Figure 3f). We speculate that the observed differences in terms of number of hCD63-positive EVs and h*Sema3A* concentration between the two xenografted

models result from the experiment length (11 versus 5 weeks) and tumour size, with an estimated average tumour volume of 600 mm³ and 270 mm³, respectively. Altogether, our data suggest that tumour-derived EVs could disseminate throughout the organism while transporting *Sema3A*.

Peripheral blood-isolated EVs from glioblastoma patients promote vascular permeability through a *Sema3A*/NRP1-dependent mechanism

To reinforce the proof-of-concept that tumour-derived EVs can circulate within blood stream,^{14, 17, 18} EVs were prepared from peripheral blood samples of newly diagnosed GBM patients (Table 1). Flow cytometry analyses indicated that the overall pattern of size and granularity, as well as Annexin V and CD63 staining were comparable between GBM patients and healthy donor peripheral blood-extracted EVs (Figure 4a). Interestingly, EVs were able to significantly foster vascular leakage with a 3 fold average induction, only when isolated from GBM patients, as assessed in an *in vivo* Miles assay (Figure 4b). Barrier integrity was next investigated using *in situ* brain microcirculation permeability assay. Massive perivascular Evans blue illustrated the pro-permeability effects of GBM patient-EVs, as compared to healthy donor-EVs (Figure 4c). Further immunofluorescence quantifications confirmed dye leakage upon EV exposure that was again observed in both hemispheres (Figure 4c). Notably, Evans blue extravasation was not significantly enhanced in the cerebellum (Figure 4c). We then measured *Sema3A* levels in healthy donor- and GBM patient-EVs by ELISA. *Sema3A* concentration was

intradermic injected mice with purified EVs from healthy donors (Healthy, green) or GBM patients (GBM, orange). *, $p < 0.05$. **(c)** Intensity of Evans blue extravasation was quantified in left and right hemispheres, including all brain areas (whole), only cerebrum (crb), or cerebellum (crbellum). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **(d)** *Sema3A* concentrations were measured by ELISA in purified-EV from healthy donors (green, $n=15$) or GBM-patient sera (red, $n=4$). ***, $p < 0.001$. **(e)** Mice received intradermic injections of blocking (aNRP1^A and aNRP1^B) and control antibodies (IgG) together with purified GBM patient sera-derived EVs (GBM-EVs). Vascular permeability was measured using *in vivo* Miles assay. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **(f)** Graphs show the quantification of Evans blue signal intensity from confocal analysis of mouse epidermis after Miles assay. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Each panel is representative of at least three independent experiments.

remarkably elevated in GBM-patient (n=4), when compared to healthy donor vesicles (n=15), with a mean concentration of 1769 ± 647.2 versus 195.8 ± 81 pg/ml (Figure 4d). Taking advantage of the previously described NRP1 blocking antibodies,²³ co-injection of aNRP1A alleviated the increase in vascular permeability in response to GBM patient-EVs. Notably, aNRP1B administration did not oppose to EV-induced vascular permeability (Figure 4e). Further confocal analyses of skin-injected areas revealed that Evans blue foci were readily observable in control antibodies- and aNRP1B-treated conditions. This EV-driven effect on vascular leakage was annihilated when aNRP1A antibodies were administered (Figure 4f). Collectively, our data demonstrate that a heightened concentration of Sema3A can be detected in peripheral blood-isolated EVs from a small cohort of newly diagnosed GBM patients. Isolated EVs can then promote vascular permeability through Sema3A receptor NRP1-dependent/VEGF-independent mechanisms.

DISCUSSION

In summary, we report that GSCs, which compose a small sub-population of self-renewing malignant cells responsible for initiation and recurrence of GBM, have the ability to elevate vascular permeability in vitro and in vivo through the secretion of vesicles in their surrounding milieu.

Among the carried cues of this mixed vesicle populations, we found Sema3A, which was previously reported as a permeability factor, shared between GBM patient-derived cells independently of their classification.^{9, 12} In this context, the guidance molecule acts via its receptor NRP1 and independently of VEGF action. Indeed, blocking antibodies engineered to hamper NRP1/VEGF binding have no significant impact on EV-driven vascular permeability in vitro and in vivo, while antibodies that target NRP1/Sema3A interaction abrogate EV effects. Collectively, our results suggest

that Sema3A emerges as a key factor involved in endothelial permeability processes. Because alternate factors can be released within EVs by tumour cells,¹⁴ further characterization of EV composition could be valuable to depict GSC/endothelial interaction in brain tumours. Moreover the fact that Sema3A was mostly found enriched in the exosomal fractions raise the question of assessing the mechanisms involved in protein sorting within particular exosome or microvesicle subsets among the whole EV population.

Both ex vivo and in vivo models establish that Sema3A is directly produced by GSCs when cultured in conditions that maintain their stemness-like properties, while barely expressed in their differentiated adherent counterparts. Although Sema3A expression appears restricted to few cell compartments, we cannot exclude that other cell types within the tumour microenvironment, such as infiltrating macrophages, can be additional providers of Sema3A.¹³ In a two-pronged mechanism, myeloid cells recruited in a Sema3A/NRP1-dependent fashion could then promote angiogenesis by secreting pro-angiogenic factors, further contributing to recurrence and aggressiveness of GBM.^{24, 25} Furthermore, hypoxia and tumour progression were suggested to impact on Sema3A levels of expression.^{13, 26} For instance, Sema3A may bypass the effects of anti-angiogenic drugs in mouse models, mainly by opposing to VEGF-controlled hypoxia pathways.^{10, 11, 13, 26} However, Sema3A expression was shown to be induced upon hypoxia and orchestrate inflammation-driven angiogenesis.¹³ Sema3A serves thus ambivalent functions, as it is a direct anti-angiogenic factor in cancers, while it promotes permeability and tumor-associated macrophage recruitment through NRP1. From a therapeutical point of view, while anti-angiogenic therapies emerge into clinics,²⁷⁻³¹ recent phase III randomized clinical trials using anti-VEGF bevacizumab showed no overt benefice.^{7, 8}

It is more likely that VEGF is not the only pro-angiogenic factor within glioblastoma and that other angiogenic modifiers should be considered.^{9, 32, 33} In this context, preventing EV-membrane Sema3A actions or targeting NRP1 with BBB-crossable humanized blocking antibodies could operate on multiple cellular targets within the tumor microenvironment to counteract vascular leakage and oedema formation, as well as inflammatory cell recruitment and hypoxia-mediated adaptation. Future work will therefore need to focus on delineating these apparent counterpoising roles for Sema3A in order to engineer an efficient strategy for anti-angiogenic-based therapies.^{9-13, 26}

In addition, recent studies have brought circulating EVs to light as candidates for diagnostic purposes and/or monitoring of tumour microenvironment status.^{14, 17, 18} For instance, specific enrichment of proteins and mRNAs within the tumour shed-EV fractions can be modulated by hypoxic conditions and impact in turn on tumour growth and angiogenesis.¹⁷ This mode of tumour communication appears not restricted to the nearby microenvironment but can further be disseminated in the blood stream. In keeping this idea, exosomal contents can be exploited to screen accessible fluids for the purpose of diagnosis.¹⁴ However, both quantity and identity of markers to be tested are rather limited. A powerful tool based on microfluidic chip has been recently engineered to analyse exosomes in various fluids and to enhance sensitivity thresholds.^{18, 34} As Sema3A is present at the membrane of GSC-secreted exosomes, Sema3A could be a valuable protein to be easily analysed from circulating blood or cerebrospinal fluid. Along with conventional medical imagery and active surveillance, this might help to establish early molecular diagnosis upon relapse and to evaluate individual responses to treatment. Together with previous reports on circulating EV composition in GBM,^{14, 17, 18} our study

thus suggests that EV-transported Sema3A could be used as a biomarker for prognostic, theranostic and response to treatment purposes.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement and clinical samples

Patients all signed a written informed consent before sample collection, which occurred for diagnostic purposes. This study abides the rules of the Helsinki Protocol. Peripheral blood (3 ml) was collected in heparin-containing tubes from GBM patients (Val-de-Grace Hospital, Paris, France) and from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France). For each patient and healthy donor, serum-derived EVs were resuspended in 500 µl of 0.22 µm filtered-vehicle.

Animals

All animal studies were performed according to the local ethics committee (Universite Paris Descartes, Paris, France) and French Ministry of Research approved protocols (agreement numbers #2034.03 and #14-025). All experiments were performed in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Six weeks-old female BALB/c nude mice (Janvier, Saint-Berthevin, France) were used.

Ectopic- and orthotopic-GSC xenografts

For sub-cutaneous xenograft development, 1.106 cells were injected in both flanks in a mix (1:1) of 100 µl PBS and growth factor-free matrigel (Corning, Chorges, France). For intracranial xenograft development, 1.105 cells in 5 µl of PBS were injected in the right striatum with a Hamilton-syringe. Peripheral blood was harvested at eleven and five weeks post ectopic and orthotopic implantation respectively, by intra-cardiac puncture immediately upon euthanasia. For each animal, blood withdrawal was normalized and 500 µl of collected blood was then subjected to EV purification by ultracentrifugation. Tumours and tissues were collected and included in OCT for further analysis.

Primary glioblastoma cell culture

Patient-derived glioblastoma cells were obtained from primary glioblastoma tumour resection and cultured ex vivo as previously described.⁴ Briefly, tumours were dissociated using the gentle MACsDissociator (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Neurospheres formed were cultured in DMEM/F12 supplemented with N2, G5 and B27 (Life

Technologies, Cergy-Pontoise, France), plus 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). To induce differentiation, GSCs were cultured in mitogen-free medium for 6h of starvation in DMEM GlutaMAX (Life Technologies) to allow adhesion and maintained for 3 days in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% FBS plus 1% penicillin/streptomycin. Conditioned media from GSCs were prepared from 1.106 (in vitro studies) or 1.107 (in vivo studies) cells cultivated in DMEM/F12 plus 1% penicillin/streptomycin for neurospheres (NS), and in DMEM GlutaMAX plus 1% penicillin/streptomycin for adherent condition (Adh). Media were collected 2 days later and processed for EV purification by ultracentrifugation steps.

Cell culture and silencing RNA

Immortalized human brain microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) and HEK293T (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) were expanded as described previously.⁹ Conditioned media from HEK293T were prepared from 1.106 (in vitro studies) or 1.107 (in vivo studies) adherent cells cultivated in DMEM plus 1% penicillin/streptomycin. Media were collected 2 days later and processed for EV purification by ultracentrifugations.

Non-silencing (Low GC Duplex) negative control, and the following predesigned Stealth siRNA oligonucleotides (Life Technologies) were transfected into cells using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) at a final concentration of 25 nM: siSEMA3A (HSS115876) and siNRP1 (HSS113022). The preparation of conditioned medium from transfected cells began two days after transfection to ensure optimal protein depletion.

Antibodies

The following antibodies were used: Semaphorin 3A (ab23393, Abcam, Paris, France), Alix and Claudin5 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), mouse and human CD63, PECAM (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Ter119 (R&D Systems, Lille, France), CD9, Hsp70, Rab4, EEA1 (System Biosciences, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), Tom20, Kinectin (Cell Signaling, Ozyme), Annexin V, SytoRNA Select and Choleratoxin (Life Technologies). HRP-conjugated (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, United Kingdom) or fluorochrome-coupled (Life Technologies) specie-specific secondary antibodies were used. NRP1 blocking antibodies and control human IgG were obtained from Genentech (San Francisco, CA, USA)²³ and used for in vitro and in vivo studies at 25 and 175 mg/ml, respectively.

EV purification and PKH-67 labelling

EVs were isolated through differential ultracentrifugation steps of the conditioned medium (Supplementary Figure 1) using L-70 ultracentrifugation with SW55 or SW28 rotors (Beckman, Villepinte, France) and appropriate tubes.¹⁶ Briefly, samples were first successively centrifuged at 300g (5 min), 2.000g (10 min), 10.000g (30 min), and 100.000g (2h). Pellets were then washed twice in PBS and re-suspended in 0.22 μ m filtered-vehicle. Microvesicle and exosome fractions were isolated based on established protocol.²¹ Briefly, after 300g (5 min) and 2.000g (20 min) centrifugation steps, supernatants were centrifuged at 16.500g (30 min) to obtain a pellet of microvesicles. The supernatant was filtered at 0.22 μ m, centrifuged at 120.000g (2h) and finally washed in filtered-PBS.

For PKH-67 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) labelling, EVs were diluted (1:3, final volume of 1.5 ml) in Diluent C and stained with 5 μ l of PKH-67 for 5 min at room temperature with regular shaking. Reaction was stopped by adding 0.22 μ m filtered-1% BSA and followed by 100.000g centrifugation for 2 h. Pellets were washed twice with 0.22 μ m filtered-PBS (PBSF), while supernatants from the last wash served as a control for background fluorescence (Figure 1d-f and Supplementary Figures S4-5). PKH-67-labelled EVs were re suspended in PBSF or 0.22 μ m filtered-serum free media.

Flow cytometry analysis

Samples were analysed with a MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotec) for Figure 1b, and Accuri C6 cytometer (BD Biosciences) for other flow cytometry experiments (CYBIO Plateform, Institut Cochin, Paris, France). Files were processed and analysed using CFlow plus software (BD Biosciences). 100 μ l of purified EVs re-suspended in 0.22 μ m filtered-PBS were incubated 1h at room temperature in the dark with 15 μ l PE-coupled CD63 antibody (BD Biosciences) or 12 μ l Annexin V Alex Fluor 488 (Life Technologies) with adequate Annexin V buffer provided. PE-conjugated isotype was used to control for CD63 staining, and 1X Annexin V Buffer (Life Technologies) for Annexin V staining. PKH-67 positive events were gated and analysed based on the fluorescence background from the last PKH-67 wash.

Proteinase K treatment and RNase protection assay

PBS resuspended GSC-EVs were incubated with proteinase K (Sigma) at 50 μ g/ml or the same volume of water as control, for 20 min at 37°C with regular shaking. Proteinase K was inhibited with PMSF 5 mM treatment, 10 min at room temperature followed by 5 min at 72°C. EVs

were then lysed in lysis buffer and analysed by western-blot.

GSC-EVs resuspended in RNase free water were incubated with combination of SDS 1% (Sigma), and RNase A (Life Technologies) 100 µg/ml for 20 min 37°C with regular shaking. 200 U of RNase OUT (Life Technologies) were used to stop the reaction, and mRNA was then extracted using RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) as per manufacturer's directions. Equal amounts of RNA were reverse transcribed and the resulting cDNA was used to amplify GAPDH transcripts by PCR using gene-specific GAPDH (Fwd: 5'-ACTTCACCTTCCCTCCAACC-3'; Rev: 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3') primers.

ELISA

EVs were disrupted by a pre-treatment with 0.5% SDS followed by 72°C incubation for 10 min. Sema3A protein concentration was then estimated by ELISA as per manufacturer's instruction (Cusabio, Clinisciences, Nanterre, France).

Permeability assays

In vitro brain endothelial permeability and in vivo Miles permeability assays were performed as described previously.⁹ For in situ brain microcirculation assay, deeply anesthetized mice were injected systemically with 0.22 µm filtered-2% Evans Blue dye solution diluted in PBS. A craniotomy of 0.5 cm² wide was performed on the left hemisphere using a surgical micro-drill (Bioseb, Vitrolles, France). Tested conditions (cell derived EVs) or saline-vehicle were deposited on top of the intact dura mater as a drop of 100 µl. Following 40 min of incubation, mice were sacrificed, blood harvested by intra-cardiac puncture and animals perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS. Tissues were collected, rinsed in PBS, and preserved in OCT for further histological analysis.

Immunostaining and confocal analysis

Immunofluorescence on adherent cells was performed as described previously.⁹ Endothelial cells were grown on coverslides pre-coated with type I collagen (Corning) until they form a confluent monolayer. Cells were stimulated 1h at 37°C 5% CO₂, with GSC#1 or #4 derived EVs labelled with the lipophilic dye PKH-67 and resuspended in endothelial cell EBM2 serum free medium (Lonza, Levallois, France). Adherent cells were fixed for 10 min with 4% PFA diluted in PBS, and blocked in PBS-BSA 3% prior incubation with Phalloidin (Life Technologies) or anti-VE-cadherin antibody (Santa Cruz).

Purified vesicles were added overnight, 4°C, on a poly-L-lysine slide, blocked 30 min at 4°C with 0.22 µm filtered PBS-BSA, and then stained overnight at 4°C. After washes and secondary antibody incubation, slides were mounted with

prolong gold anti-fade mountant with DAPI (Life Technologies). Events containing nucleic acid staining (DAPI) were acquired using numerical magnification.

Mouse tissue sections, 7 µm of thickness, were obtained after cryosection of brain or xenograft tumour included in OCT with Leica cryostat (Histology platform, Institut Cochin, Paris). Sections were fixed 20 min in 4% PFA, permeabilized 10 min with PBS-Triton 0.5% and blocked with 3% PBS-BSA 2 hours prior staining. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Pictures were acquired with TCS/SP5 Leica confocal microscope (Institut Cochin, Paris, France).

Quantitative analysis of blood vessel leakage

All quantifications were done on high-resolution confocal images representing a 0.30 µm section of the murine brain. In each brain analysed at least 5 field-of-view (fov) were acquired, for a minimum of three independent experiments (≥15 fov per condition). For Evans Blue and Ter119 quantification, a macro was set-up with Image J software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014). 8-bit type pictures were first subjected to a threshold which parameters were representative to the best signal coverage relative to background. Particles were then analysed independently of their circularity (0-1) and their size (0-1) in each fov. A mean of total pixel area was then represented for each condition.

Electron microscopy and immunogold labelling

Cleaned EV pellets were re-suspended in 0.22 µm filtered-PBS or fixed (0.22 µm filtered-PBS-PFA 4%, 6h, 4°C) for direct acquisition and immunogold labelling, respectively. Samples were added on the formvar/carbon-coated grid overnight 4°C. EVs were incubated with 0.1% bovine serum albumin, 10% normal donkey serum (20 min), followed by incubation with anti-CD63 and Sema3A antibodies (1:100 and 1:25 dilution in PBS plus 0.1% bovine serum albumin and 4% normal donkey serum, respectively). After extensive washes, sections were incubated with gold-labelled secondary antibodies with a gold particle size of 10 nm (GAM 10, British Biocell International), washed again, stained with 2% uranyl acetate (10 min) and air-dried. Vesicles were examined using a transmission electron microscope (EM10CR, Zeiss, Imagery facility, Institut Cochin, Paris, France).

Standard protocols were used for RT-PCR and western-blots.⁹

Statistical analysis

Data are representative of at least 3 independent experiments. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism6 or Microsoft Office Excel software using two-way analysis of variance (ANOVA) and an unpaired two-tailed t-test (Student's t test), as specified in the legends to figures.

Conflict of interest: The authors declare they have no competing financial interests.

Acknowledgments: The authors are thankful to present and past members of the team, especially to Héloïse Leclair and Armelle Le Guelte. We are grateful to Robin Lombard (Mytenyi Biotech, Paris, France) for technical assistance with the MacsQuant cytometer. We are also grateful to PO Couraud and F. Niedergang's team (Institut Cochin, Paris, France) for helpful discussion and reagents. This research was funded by: Fondation pour la Recherche Médicale, Institut National du Cancer INCA_6508, Ligue nationale contre le cancer comité de Paris. LT is supported by doctoral fellowship from Université Paris Descartes. EMGM, EHW, and SA are supported by post-doctoral fellowships from Ligue nationale contre le cancer, Canceropole Ile-de-France, and Fondation ARC Association pour la Recherche sur le Cancer, respectively.

REFERENCES

- 1 Yan K, Yang K, Rich JN. The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Current opinion in neurology* 2013; 26: 701-707.
- 2 Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004; 23: 9392-9400.
- 3 Galan-Moya EM, Le Guelte A, Fernandes EL, Thirant C, Dwyer J, Bidere N et al. Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Rep* 2011; 12: 470-476.
- 4 Galan-Moya EM, Treps L, Oliver L, Chneiweiss H, Vallette FM, Bidere N et al. Endothelial secreted factors suppress mitogen deprivation-induced autophagy and apoptosis in glioblastoma stem-like cells. *PLoS One* 2014; 9: e93505.
- 5 Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 2007; 11: 69-82.
- 6 Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007; 11: 83-95.
- 7 Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 709-722.
- 8 Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 699-708.
- 9 Le Guelte A, Galan-Moya EM, Dwyer J, Treps L, Kettler G, Hebda JK et al. Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *J Cell Sci* 2012; 125: 4137-4146.
- 10 Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M et al. Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest* 2009; 119: 3356-3372.
- 11 Casazza A, Fu X, Johansson I, Capparuccia L, Andersson F, Giustacchini A et al. Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 741-749.
- 12 Acevedo LM, Barillas S, Weis SM, Gothert JR, Cheresh DA. Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* 2008; 111: 2674-2680.
- 13 Casazza A, Laoui D, Wenes M, Rizzolio S, Bassani N, Mambretti M et al. Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer Cell* 2013; 24: 695-709.
- 14 Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-1476.
- 15 Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2014; 20: 385-393.
- 16 Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-289.
- 17 Kucharszewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringner M et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7312-7317.
- 18 Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 2012; 18: 1835-1840.
- 19 Thirant C, Galan-Moya EM, Dubois LG, Pinte S, Chafey P, Broussard C et al. Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells* 2012; 30: 845-853.
- 20 Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1223-1234.
- 21 Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani U et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* 2013; 2.
- 22 Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359-371.
- 23 Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007; 11: 53-67.

- 24 Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach JV et al. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol* 2012; 14: 1379-1392.
- 25 Chen X, Zhang L, Zhang IY, Liang J, Wang H, Ouyang M et al. RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma. *Cancer Res* 2014; 74: 7285-7297.
- 26 Maione F, Capano S, Regano D, Zentilin L, Giacca M, Casanovas O et al. Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 1832-1848.
- 27 Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4722-4729.
- 28 Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4733-4740.
- 29 Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 740-745.
- 30 Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M et al. Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2011; 29: 142-148.
- 31 Narayana A, Gruber D, Kunnakkat S, Golfinos JG, Parker E, Raza S et al. A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg* 2012; 116: 341-345.
- 32 Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S et al. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One* 2012; 7: e45562.
- 33 Le Guelte A, Dwyer J, Gavard J. Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. *Biol Cell* 2011; 103: 593-605.
- 34 Shao H, Chung J, Lee K, Balaj L, Min C, Carter BS et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature communications* 2015; 6: 6999.

SUPPLEMENTAL FIGURES

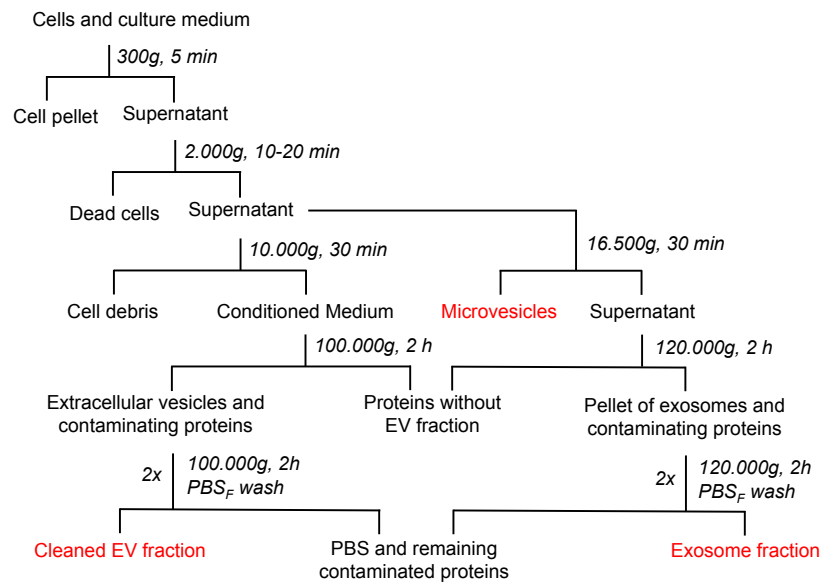


Figure S1. Representative protocols of extracellular vesicles, microvesicles and exosomes isolation by increased ultracentrifugation steps. Extracellular vesicles (EV) or exosomes pellet was washed in 0.22 μ m-filtered PBS (PBS_F) and then resuspended in 0.22 μ m-filtered vehicle.

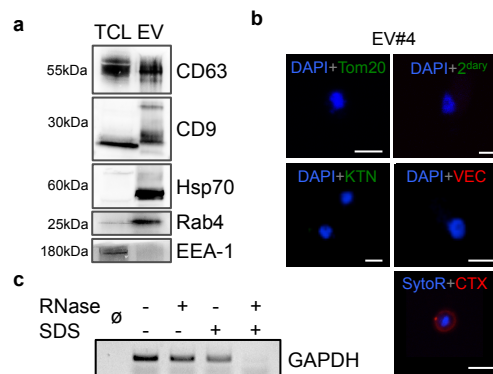


Figure S2. GSC-EV characterisation. (a) GSC#4 (TCL) or GSC#4-derived EV (EV) were lysed and analysed by western-blot for the exosomal markers CD63, CD9, Hsp70 and Rab4, but also for the late endosomal marker EEA-1. (b) Pictures of purified EV#4 by confocal analysis and stained for mitochondrial import receptor subunit (Tom20), endoplasmic reticulum resident protein Kinectin (KTN), secondary antibody alone (2ndary), endothelial marker VE-cadherin (VEC), RNA specific SytoRNA probe (SytoR) and lipid raft cholera toxin (CTX). Scale bar, 500 nm. (c) RNase protection assay performed on purified GSC#1-derived EV treated with different combination of RNase A and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). EV-RNA was then extracted and RT-PCR with GAPDH primers performed.

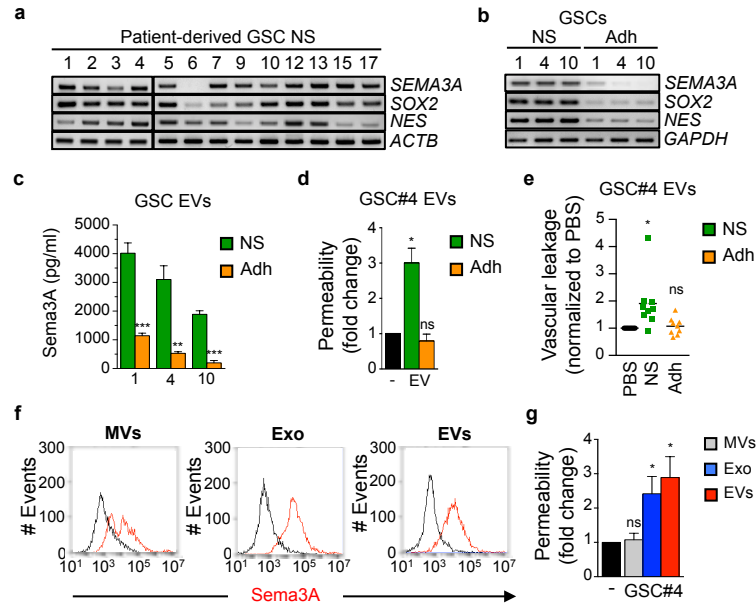


Figure S3. Sema3A expression in human patient-derived GSCs and in secreted vesicles is lost upon adherent culture condition. (a, b) Sema3A and the neuronal stem-cell markers Sox2 and Nestin (NES) were checked by RT-PCR on different patient-derived GSC cultured as neurospheres (NS) or adherent (Adh). Actin (ACTB) and GAPDH were used as a loading controls. (c) Sema3A concentrations were measured by ELISA in purified EVs from different GSC cultured as NS or Adh. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$. (d) Permeability was measured in brain endothelial cells exposed to purified EVs from GSC#4 cultured as NS or Adh. Results are expressed as fold change to untreated conditions (-). *, $p < 0.05$. (e) Evans blue dye extravasation (Miles assay) of intradermic injected mice with saline control (PBS) and purified EVs from GSC#4 cultured as NS or Adh ($n = 10$). Values are expressed as fold change to PBS-injected samples. *, $p < 0.05$. (f) Flow cytometry analysis of Sema3A expression in purified GSC#4-MVs, Exosomes (Exo) and EVs (red line). Black line is MVs, exos or EVs with PE-conjugated isotype control. (g) Permeability was measured in brain endothelial cells exposed to purified MV, exo or EVs from GSC#4. *, $p < 0.05$. Each panel is representative of at least three independent experiments.

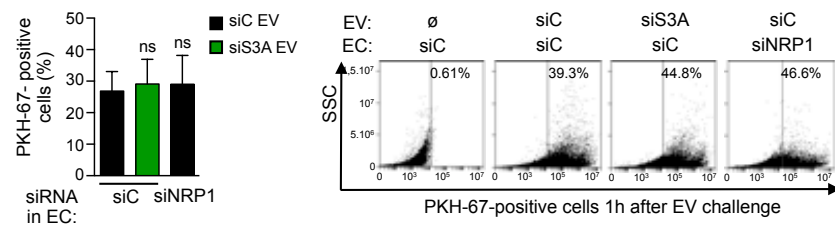


Figure S4. Efficiency of EV uptake by endothelial cells in siRNA experiments. Patient-derived GSC#4-EV, either non-depleted (siC EV) or depleted for Sema3A (siS3A EV), were stained with the lyophilic marker PKH-67 and used to stimulate endothelial cells (EC) transfected with control- (siC) or NRP1- (siNRP1) silencing RNA. Right, flow cytometry dot plots of PKH-67 positive cells after 1-hour stimulation with PKH-67-stained EV#4. Ø: EC treatment with PKH-67 last wash. Left, representative percentage of PKH-67 positive cells.

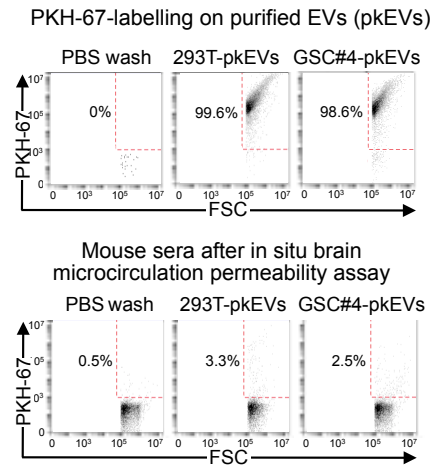


Figure S5. EV uptake during *in situ* brain microcirculation permeability assay. Top panels, flow cytometry analysis of HEK293T- (293T-pkEVs) and GSC#4- (GSC#4-pkEVs) derived EVs after PKH-67 labelling. During PKH-67 EV-labelling, multiple round of PBS wash and centrifugation were performed to obtain a clean PKH-67-EV fraction. The supernatant (depleted from EVs) obtained after the last washing step was used as negative control for fluorescence. *In situ* brain microcirculation permeability assay was performed with PKH-67 PBS wash, 293T- or GSC#4-pkEVs. After 40 min of incubation, animals were sacrificed and mice sera were collected and analysed by flow cytometry (bottom panels) for PKH-67 positive events.

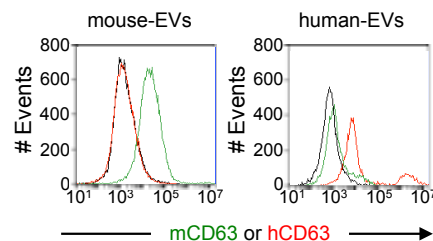
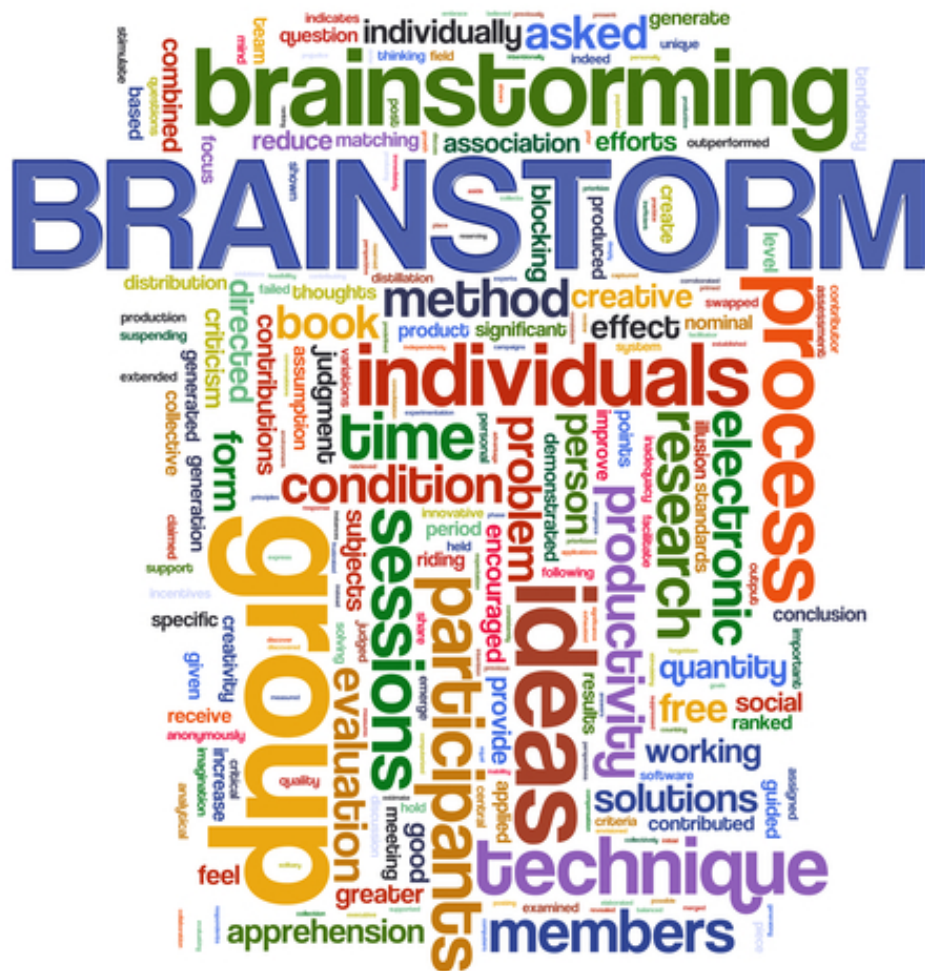


Figure S6. Specificity of murine and human anti-CD63 antibodies. Flow cytometry analysis of mouse serum-derived (mouse-EVs) and GSC#4-derived EVs (human-EVs) for murine (m) and human (h) CD63 expression. Black line is murine or GSC#4-EVs alone without staining as negative control.

Discussion



Chapitre V Discussion

I La Sémaphorine 3A, un nouveau sheriff en ville

Initialement décrites pour leur rôle physiologique dans le développement du système nerveux central, les sémaphorines ont depuis été caractérisées dans de nombreux autres processus dont le développement tumoral. Via leurs récepteurs plexines et neuropilines, les sémaphorines peuvent moduler le cytosquelette d'actine, et ainsi affecter l'adhérence cellulaire, mais aussi la morphologie et la migration (Sakurai et al., 2012). De fait, ces processus sont largement dérégulés dans les cancers, et en particulier lors de la progression tumorale.

I.1 La Séma3A : un réel facteur anti-angiogénique?

Sur la base de l'action anti-migratoire avérée de la Sémaphorine 3A (Séma3A) dans les cellules neuronales, l'effet potentiellement anti-angiogénique de cette molécule a été étudié dans les cellules endothéliales. En effet, plusieurs études ont décrit l'action anti-angiogénique de la Séma3A, capable notamment de s'opposer *in vitro* à la formation de tubes endothéliaux en Matrigel et à la migration endothéliale de HUVEC, induites sous l'effet du VEGF (Acevedo et al., 2008; Guttman-Raviv et al., 2007; Vacca et al., 2006). De façon intéressante, que ce soit par utilisation de protéine recombinante (Vacca et al., 2006) ou introduction d'un vecteur adénoviral (Maione et al., 2009), la réexpression de la Séma3A réduit la motilité et le caractère invasif des tumeurs. De même, la surexpression de Séma3A permet de réduire la vascularisation tumorale et la taille des tumeurs dans différents modèles de xénogreffes tels que les carcinomes mammaires (Casazza et al., 2011) et tumeurs pancréatiques (Maione et al., 2009). Ces études posent donc les bases de l'utilisation potentielle de la Séma3A comme un outil thérapeutique.

Comme exposé dans l'introduction, la progression tumorale requiert la formation d'un réseau vasculaire dédié, qui implique notamment la dérégulation de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. En comparant des cellules endothéliales issues de gammopathies monoclonales (MG-EC), c'est-à-dire des tumeurs faiblement vascularisées et peu agressives, à celles de myélomes multiples (MM-EC) de stade plus avancé, les auteurs ont étudié les acteurs du *switch* angiogénique (Vacca et al. 2006). Une perte d'expression de la Séma3A dans les MM-EC a ainsi été démontrée, tandis que les taux de VEGF, Nrp-1 et Plxn-A1 augmentent (Vacca et al., 2006). Par ailleurs, il existe une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la Séma3A et la progression tumorale dans des modèles de souris

développant spontanément des tumeurs pancréatiques ou utérines (Maione et al., 2009). C'est également le cas dans des échantillons cliniques provenant de carcinomes de l'ovaire (Jiang et al., 2015), de carcinomes de la peau (Song et al., 2012), de mélanomes et cancers du sein (Nehil et al., 2014), ainsi que de tumeurs du poumon (Zhou et al., 2014). Ensemble, ces travaux soulignent que l'expression de la Séma3A est perdue lors de la progression tumorale du passage des stades modérés à agressifs (Figure 33).

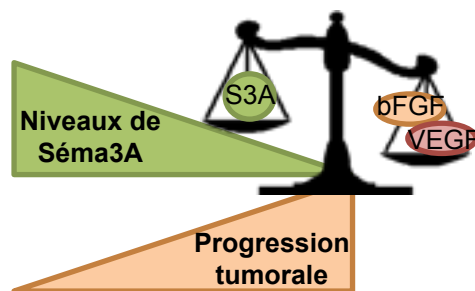


Figure 33. Perte d'expression de la Séma3A durant la progression tumorale. La Séma3A, exprimée durant les premiers stades de la tumorigenèse, est ensuite réprimée lors du *switch* angiogénique au profit de molécules telles que VEGF ou bFGF.

Une récente étude a décortiqué un des modes potentiels de répression de cette protéine. L'extinction stable de HMGB1 (*High Mobility*

Group Box 1) dans des lignées de cancer du sein et de mélanome amoindrit leur potentiel migratoire et métastatique *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, l'étude transcriptomique des cellules déplétées en HMGB1 révèle une surexpression transcriptionnelle de la Séma3A dont le promoteur apparaît moins réprimé par méthylation (Nehil et al., 2014). De cette façon, l'expression de la Séma3A est éteinte par répression transcriptionnelle et verrouillage chromatinien dans les tumeurs agressives et à fort potentiel métastatique. Ainsi, cette sémaphorine apparaît comme une protéine dont l'extinction est un prérequis lors de la progression tumorale.

Une étude récente révèle que la Séma3A, sécrétée par les cellules cancéreuses de carcinomes pulmonaires de Lewis (LLC), permet de recruter des macrophages dans le cœur hypoxique de la tumeur par un mécanisme dépendant de la Nrp-1 (Casazza et al., 2013). Dans cette étude, l'expression de la Séma3A a été étudiée de façon globale, et sans distinction de potentielles sous-populations tumorales. En effet, nos travaux ont mis en lumière une sécrétion de Séma3A, au travers de vésicules extracellulaires (EV), majoritairement effectuée par la population de CSG. D'autre part, au sein de xénogreffes sous-cutanées de LLC, il a été montré qu'une sous-population de cellules cancéreuses à caractère souche sécrète des EV capables de reprogrammer des cellules souches normales en phénotype malin (Yan et al., 2014b). De fait, dans l'étude de Casazza et collaborateurs, nous pouvons spéculer que la Séma3A serait davantage sécrétée par une sous-population tumorale initiatrice plutôt que par la masse tumorale. Ainsi, augmenter les niveaux d'expression de la Séma3A ne serait pas

forcément une bonne stratégie, car cela pourrait induire le recrutement tumoral de macrophages, et de fait promouvoir la vascularisation et la tumorigénèse.

Ensemble ces données indiquent un rôle clairement anti-migratoire de la Séma3A *in vitro* et une diminution globale de son expression lors de la progression tumorale. Cependant, les interactions entre signalisation VEGF et Séma3A dans ce contexte, ainsi que la place de la Nrp1 demeurent ambiguës. En outre, le profil d'expression de la Séma3A n'est pas homogène dans la masse tumorale et plusieurs cibles cellulaires du microenvironnement pourraient exercer des effets contradictoires et antagonistes, qui ne sont pas accessibles *in vitro*, ni dans des modèles de surexpression ectopique *in vivo*.

1.2 Comment la Séma3A induit la perméabilité vasculaire ?

Au sein des tumeurs, les vaisseaux sont désorganisés et caractérisés par une perméabilité vasculaire anormalement haute. Alors que la Séma3A et le VEGF ont des rôles opposés concernant la formation de néovaisseaux, ces deux molécules exercent une action pro-perméabilité comme démontré en contexte physiologique par stimulation *in vitro* de HUVEC (Acevedo et al., 2008). De même, dans des modèles de souris développant des xénogreffes sous-cutanées de carcinome mammaire, la délivrance systémique de Séma3A induit une forte extravasation tumorale de Dextran 70 kDa (Casazza et al., 2011). Dans ces travaux, ainsi que dans un modèle de développement de rétinopathie liée au diabète (Cerani et al., 2013), l'augmentation de la perméabilité vasculaire dépend de la Nrp-1. En effet, la Séma3A et le VEGF n'ont plus d'effet sur la perméabilité vasculaire dans des souris dont la Nrp-1 est invalidée dans le compartiment endothélial (Acevedo et al., 2008). Les résultats de notre laboratoire abondent dans ce sens puisque l'extinction transitoire de Nrp-1 ou Plxn-A1, dans les cellules hCMEC/D3 récapitulant la BHE, prévient l'augmentation de la perméabilité endothéliale après leur stimulation avec du milieu conditionné pro-perméabilité de CSG (Le Guelte et al., 2012). Via les partenaires Nrp-1/Plxn-A1, et selon le contexte cellulaire, la Séma3A peut alors promouvoir la perméabilité endothéliale soit de façon dépendante de Src dans des cellules endothéliales ou rétinienne (Cerani et al., 2013; Le Guelte et al., 2012), soit de façon dépendante de la PI3K γ/δ dans des cellules endothéliales ombilicales (Acevedo et al., 2008).

Un autre mode d'action de la Séma3A a récemment été proposé dans le cerveau de rat. En effet, dans un modèle d'ischémie cérébrale, la Séma3A augmente la perméabilité vasculaire

de façon dépendante de la Nrp-2, plutôt que de la Nrp-1. Dans ce système expérimental, l'induction de la perméabilité par la Séma3A est uniquement contrecarrée par un anticorps bloquant la Nrp-2, ou Mical2 (*Molecule Interacting with CasL-2*) (Hou et al., 2015). Mical est une protéine cytoplasmique s'associant à la vimentine et à la plexine de classe A, et qui est requise pour médier les signaux répulsifs des sémaphorines sur les neurones lors du développement neural (Terman et al., 2002). Ainsi au sein du système nerveux central, la Séma3A pourrait alors augmenter la perméabilité vasculaire selon deux modes distincts : Nrp-1/Plxn-A1/Src qui déstabilise la VE-cadhérine (Cerani et al., 2013; Le Guelte et al., 2012), et VEGFR-1/Nrp-2/Mical2 induisant une disruption de l'actine filamenteuse et un relâchement des jonctions endothéliales (Hou et al., 2015). En effet, mes résultats montrent que l'augmentation de la perméabilité requiert la Nrp-1, puisque le blocage de son domaine de fixation pour la Séma3A par anticorps abroge presque entièrement l'effet pro-perméabilité des EV de CSG. Le choix entre Nrp-1 et -2 pourrait être dû à une expression différentielle et régionalisée des neuropilines et plexines au sein des cellules endothéliales centrales versus périphériques, ou encore au sein même de la BHE. De manière intéressante, le couple Nrp-2/Plxn-A1 induit l'attraction de cellules gliomateuses en réponse à la Séma3A, tandis que l'expression conjointe des Nrp-1, -2 et Plxn-A1 promeut la répulsion cellulaire (Nassarre et al., 2009). Récemment, un niveau supplémentaire de complexité a été ajouté en étudiant des lignées gliomateuses U87 dont la réponse répulsive ou attractive peut être modulée par l'expression des plexines de classe A (Sabag et al., 2014).

Enfin, l'équipe de L. Claesson-Welsh a depuis peu mis en lumière dans des cellules endothéliales aortiques porcines que la présentation en *trans* du complexe Nrp-1/VEGF au VEGFR-2 induit un phénotype endothélial quiescent et un retard de l'initiation tumorale dans des souris (Koch et al., 2014). Ce mécanisme est à opposer à la présentation en *cis*, sur une même cellule, qui induit un signal angiogénique puissant. Au sein de la niche vasculaire du glioblastome, ce phénomène pourrait alors, via les vésicules ou par contact direct entre CSG et endothélium, maintenir la tumeur en dormance dans l'attente d'un environnement ou de signaux plus propices au développement tumoral. De ce fait, la variation d'expression d'un des membres des plexines ou neuropilines au sein du complexe de récepteurs, ainsi que la façon dont est composée ce multicomplexe (tout *cis*, *trans/cis*), pourrait profondément moduler l'intégration au niveau cellulaire du gradient de sémaphorine.

I.3 La Séma3A un nouveau médiateur de l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral ?

Comme évoqué dans l'introduction, la protéine HIF orchestre la réponse à l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral en promouvant l'angiogenèse par activation transcriptionnelle de facteurs pro-angiogéniques (*i.e.* VEGF et FGF-2), l'autorenouvellement des CSG, et le recrutement de cellules immunitaires est également responsable de mécanismes de résistance tumorale. Dans ce sens, le traitement anti-angiogénique par le Sunitinib (inhibiteur de récepteurs à tyrosine kinase tels les VEGFRs) dans un modèle de souris développant des tumeurs pancréatiques de façon spontanée, augmente l'hypoxie intratumorale. D'autre part, le traitement par la Séma3A réduit drastiquement cette hypoxie mesurée par marquage au pimonidazole, et permet également une réduction de l'expression de HIF-1 α (Maione et al., 2012).

De façon intéressante, au sein de notre équipe nous avons observé dans les CSG que le mimétisme des conditions hypoxiques, par le chlorure de cobalt ou la Desferoxamine, augmente l'expression transcriptionnelle et protéique de Séma3A (Figure 34). De même, la quantité de vésicules extracellulaires sécrétées semble également croître après induction d'un stress hypoxique (données préliminaires du laboratoire). Ces résultats sont corrélés à une étude récente indiquant que HIF est largement surexprimé dans les cancers du sein, et que ceci est associé à une surexpression de Rab22A, protéine requise pour la synthèse des MV. En réponse à un stress hypoxique, l'inhibition stable de Rab22A par ARN interférent abroge la hausse de la production de ces vésicules (Wang et al., 2014). Ainsi, un stress cellulaire tel que

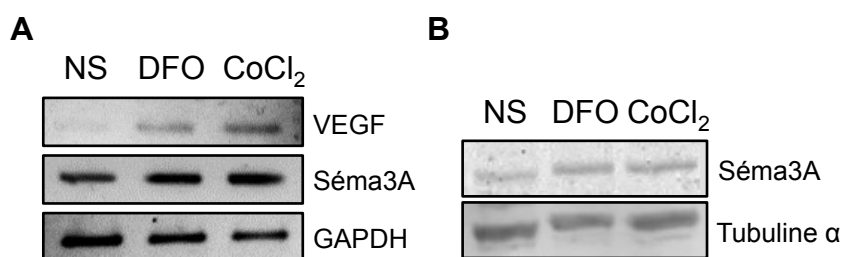


Figure 34. Induction de l'expression de la Sémaphorine 3A par mimétisme hypoxique. Des cellules souches gliomateuses sont traitées par Desferoxamine (DFO) ou chlorure de cobalte (CoCl₂) afin d'induire une anoxie. La Séma3A est analysée aux niveaux **A.** transcriptionnel et **B.** protéique après traitement.

l'hypoxie peut alors augmenter le taux de synthèse de certaines populations de vésicules, mais également moduler leur composition protéique. Dans ce sens, et en nous replaçant dans notre contexte d'étude qu'est le GBM, il a été observé que les exosomes issus de cellules gliomateuses U87 cultivées en condition hypoxique sont enrichis en protéines à propriétés angiogéniques. En outre, la stimulation endothéliale par ces exosomes à caractère hypoxique module les propriétés cellulaires, telles que la motilité des cellules cancéreuses, et les

propriétés angiogéniques des cellules HUVEC, favorisant ainsi la progression tumorale (Kucharzewska et al., 2013). Nous pouvons proposer que, parallèlement à l'induction observée à l'échelle cellulaire dans les CSG, le taux de Séma3A présent dans la fraction de EV pourrait être enrichi en réponse à l'hypoxie intratumorale.

Par ailleurs, la Séma3A est majoritairement exprimée par les CSG en comparaison aux lignées gliomateuses établies (U87) ou aux CSG différenciées, dans lesquelles l'expression de la Séma3A est perdue. Cette particularité pourrait alors créer un gradient de concentration de Séma3A dont l'action serait modulée en forte ou faible dose (Bagci et al., 2009). Puisqu'un environnement hypoxique peut induire la trans-différenciation et l'expression de marqueurs endothéliaux par les CSG (Soda et al., 2011), nous pouvons émettre l'hypothèse que les cellules endothéliales issues de progéniteurs tumoraux non différenciés, utiliseraient un gradient de Séma3A afin d'augmenter la perméabilité endothéliale. De plus, l'affaiblissement des jonctions cellule-cellule contribuerait aux étapes initiales d'angiogenèse (Bentley et al., 2014; Le Guelte et al., 2012). De même, une fois les jonctions relâchées, des cellules gliomateuses pourraient par mimétisme vasculaire former des tubes vasculaires anormaux.

Ce gradient de Séma3A permettrait également de générer, des signaux répulsifs ou attractifs dans le but de recruter des macrophages (Bagci et al., 2009). D'autre part, l'hypoxie étant également un modulateur de l'expression de la Séma3A, nous pouvons postuler que ce facteur de l'environnement participerait à renforcer ce gradient rendant alors les macrophages anergiques tout en promouvant l'angiogenèse (Casazza et al., 2013). Cet effet pourrait s'exercer localement dans le microenvironnement direct, voire à distance grâce à la dissémination systémique des vésicules extracellulaires (Treppe et al., en révision). De cette façon, la Séma3A pourrait alors créer un environnement propice au développement tumoral en modulant, d'une part la perméabilité vasculaire, et d'autre part la motilité cellulaire et le recrutement de cellules myéloïdes pro-angiogéniques.

II Les vésicules extracellulaires, des convoyeurs de fond

La composition ainsi que les marqueurs caractéristiques des différentes sous-populations de vésicules extracellulaires ne sont pas encore bien définis. Néanmoins, un nombre croissant d'études tend à donner une meilleure représentation de leurs mécanismes de formation ainsi que leurs modes d'action.

II.1 La genèse des vésicules extracellulaires et la gestion de leur contenu: mode par défaut ou sélectif ?

Les exosomes, MV et corps apoptotiques contiennent de nombreuses protéines et acides nucléiques pouvant modifier la biologie des cellules réceptrices. Dans notre étude, nous avons démontré que les EV sécrétées par les CSG augmentent la perméabilité vasculaire majoritairement au travers de la Séma3A. En revanche, le mécanisme par lequel la Séma3A est dirigée vers ces vésicules ou sécrétée de façon plus classique n'est pas encore identifié.

L'étude des exosomes révèle que ceux-ci sont majoritairement issus des MVB dont la fusion à la membrane plasmique les libère dans le milieu extracellulaire. En revanche, les MVB peuvent également fusionner aux lysosomes et y déverser leur contenu pour dégradation protéique. L'étude du CMH de classe II, qui est décrit comme excrété via les exosomes (Colombo et al., 2014), peut également être dirigé pour la dégradation lysosomale, impliquant un tatouage de la queue C-terminale par ubiquitinylation et reconnaissance par le complexe ESCRT (Buschow et al., 2010). L'étude protéomique d'exosomes purifiés de lymphocytes B révèle que l'adressage du CMH de classe II aux exosomes n'implique pas son ubiquitinylation, mais plutôt son association avec des protéines chaperonnes telles que HSC70 (*Heat Shock Cognate protein*), HSP90 (*Heat Shock Protein*), CD20, la protéine 14-3-3 ϵ ou encore la Pyruvate Kinase de type 2 (PKM2) (Buschow et al., 2010). Néanmoins, le rôle de ces dernières dans la biologie vésiculaire n'est pas connu.

Les interactions protéiques ne sont pas les seules à orchestrer l'adressage de protéines dans les vésicules. Il est connu que certaines modifications cytoplasmiques engendrent une relocalisation protéique dans des compartiments cellulaires définis. Dans ce sens, il a été montré que l'ajout d'ancres plasmatiques taguées GFP, comme la myristoylation, le domaine PIP2 ou encore CD43 dirige de façon efficace les protéines marquées vers les MV et les exosomes (Shen et al., 2011). En revanche, les cargos protéiques responsables de cet adressage et de cette sélectivité ne sont pas identifiés dans cette étude. La protéine CD43, aussi appelée leukosialine, est largement surexprimée dans les cancers du sein et corrélée à une progression tumorale de par sa capacité à activer des voies de survie impliquant la β -caténine, NF- κ B et AP-1 (Tuccillo et al., 2014). De façon intéressante, l'étude de lignées de cellules cancéreuses du sein révèle qu'une extinction transitoire de CD43 par ARN interférent engendre une diminution de l'expression de Dicer dans les exosomes issus de ces cellules (Melo et al., 2014). Dicer et Drosha sont des endonucléases permettant de transformer des ARN, arborant des structures en épingle-à-cheveux, en miARN. Par la suite, ces derniers sont incorporés dans le complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) constitué notamment

des protéines argonaute 2 (AGO2) et GW182 afin de dégrader ou réprimer la transcription d'ARN messagers cibles. Dans ces travaux, l'étude de vésicules issues de monocytes en culture indique un enrichissement de la protéine GW182 et des miARN au sein des exosomes (Gibbings et al., 2009). Ceux-ci pourraient être nécessaires à l'adressage de miARN particuliers ou, comme on le verra dans le paragraphe suivant, à l'activité biologique des exosomes.

Ainsi, le mode d'adressage des protéines aux vésicules n'est pas entièrement élucidé, mais semble faire intervenir des modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitinylation ou la myristoylation, pouvant alors moduler des interactions protéiques complexes et l'adressage de celles-ci à des compartiments vésiculaires précis. La compréhension fine du fonctionnement des complexes ESCRT permettrait de clarifier les phénomènes impliqués dans l'adressage protéique sélectif aux vésicules (Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007) et être la cible de thérapies futures par blocage spécifique de l'adressage de certaines protéines à potentiel oncogénique (par exemple EGFRvIII) ou de facteurs d'addiction non-oncogène (par exemple, la Séma3A).

II.2 Les vésicules extracellulaires : un moyen de communication et de signalisation

Les EV apparaissent comme des moyens puissants de communication de par la richesse de leur contenu couvrant une large palette d'éléments de signalisation cellulaire (protéines, miARN, chromatine, etc.). Comme mentionné ci-dessus, des protéines de maturation des miARN et du complexe RISC sont présentes dans les EV issues de lignées tumorales de souris (Melo et al., 2014). D'autre part, les EV issues de lignées métastatiques expriment davantage de miARN comparés aux lignées cancéreuses non métastatiques et aux « normosomes », c'est-à-dire des exosomes issus de cellules épithéliales mammaires non tumorales. Ces vésicules purifiées sont aptes à induire un remaniement de la réponse transcriptionnelle (*i.e.* répression de PTEN) vraisemblablement dû au transfert des miARN. Le même cas a été documenté concernant l'ARN messager codant pour EGFRvIII dans les EV de gliomes (Al-Nedawi et al., 2008; Li et al., 2013). En revanche, les taux de miARN cellulaires sont plus bas dans les lignées tumorales que dans les lignées normales. L'analyse fine des acides nucléiques des exosomes tumoraux révèle que ceux-ci contiennent une concentration plus grande de pré-miARN associés à la protéine Dicer (Melo et al., 2014). L'implantation conjointe de cellules épithéliales mammaires non tumorigéniques, associées à des exosomes issus de lignées tumorales métastatiques, induit un développement tumoral qui

est fortement réduit lorsque ces exosomes sont électroporés avec des anticorps anti-Dicer bloquant le fonctionnement de cette protéine (Melo et al., 2014). Par ce mode original de signalisation, les exosomes tumoraux peuvent, de façon indépendante de la cellule, provoquer la maturation de miARN. Cette étude montre le potentiel oncogénique transformant des exosomes, mais également les éventuelles retombées thérapeutiques par inhibition de Dicer dans ces vésicules.

Un grand nombre de travaux analyse par ailleurs le rôle de protéines et ARN messagers contenus dans les EV en tant que modulateurs du microenvironnement tumoral. Par exemple, les EV issues de lignées humaines de cancer colorectal peuvent stimuler la prolifération cellulaire de cellules endothéliales HUVEC par transfert horizontal de transcrits tels que *CDK8* (*Cyclin-Dependent Kinase 8*) et *CCNA2* (*Cycline A2*) (Hong et al., 2009). Dans notre modèle d'étude du GBM, la présence de l'ARNm de *SEMA3A* n'a pas été détectée dans les vésicules issues de CSG ou de lignée gliomateuse immortalisée U87. En revanche, les transcrits codant pour les protocadhérines *PCDHB2* et *-B5* sont présents. Le rôle de ces protéines n'est pas encore connu mais leur expression est retrouvée dans les cellules endothéliales exposées avec du milieu conditionné de CSG. Par ailleurs, à l'aide d'amorces spécifiques d'espèce, mes résultats préliminaires montrent que les ARN messagers de *PCDHB2* et *-B5* peuvent être transférés et exprimés dans des cellules endothéliales de rat Bend5, au travers des EV issues de cellules humaines. Ceci indique donc que les EV pourraient alors agir en deux temps, à court terme par stimulation directe via les protéines cytoplasmiques et membranaires exprimées par les vésicules, et à plus long terme par expression de transcrits et ARN interférents depuis la cellule réceptrice.

Enfin, selon le mode d'entrée cellulaire des EVs, des protéines membranaires et récepteurs peuvent activer des voies de signalisation. Dans nos travaux, les EV de CSG semblent davantage pénétrer par endocytose active plutôt que par un mécanisme passif de fusion membranaire. En effet, le captage de EV fluorescentes par les cellules endothéliales est largement inhibé à 4°C. De plus, des expériences d'immunofluorescence révèlent une accumulation périnucléaire de structures vésiculaires, typique des mouvements des endosomes tardifs. Néanmoins, nous avons observé un faible pourcentage de cellules arborant un phénotype différent avec une accumulation membranaire homogène du marqueur lipophile, suggérant alors un phénomène de fusion. Ce mécanisme pourrait alors, via l'expression de protéines transmembranaires, modifier la proportion des récepteurs de la cellule endothéliale, et ainsi moduler sa biologie.

Une étude récente a décrit un autre mécanisme de signalisation par les cellules souches neurales (CSN). Ces cellules, sous l'effet d'un environnement pro-inflammatoire mimé par un cocktail protéique défini, engendrent de la même façon que la réponse hypoxique (Kucharzewska et al., 2013), une modulation du contenu protéique des EV sécrétées (Cossetti et al., 2014). Les vésicules purifiées des CSN permettent d'induire la voie de réponse à l'interféron (IFN) dans des cellules fibroblastiques receveuses NIH 3T3. Au travers de l'utilisation de CSN et de fibroblastes issus de souris invalidées de façon homozygote pour STAT1, IFN-R1 ou -R2, l'équipe a découvert que les EV issues des CSN expriment le récepteur IFN-R1 couplé à l'IFN (Cossetti et al., 2014). D'une façon encore inconnue, l'IFN-R1 peut transférer l'IFN à un complexe de récepteurs membranaires cellulaires, prêt à activer la voie STAT1 dans la cellule receveuse (Cossetti et al., 2014). Ce mécanisme original pourrait également s'appliquer dans notre modèle où la Séma3A, sensible à un traitement aux protéinases K, est exprimée à la surface des EV de CSG. Néanmoins, par différentes approches biochimiques (FACS et Western-blot), nous n'avons pas pu identifier la Nrp-1 à la membrane des vésicules (données préliminaires du laboratoire). Ainsi, afin de pouvoir agir sur la Nrp-1 portée en *trans* par les cellules endothéliales hCMEC/D3, il est possible que la Séma3A puisse être lié à un autre récepteur, ou directement associée aux glucosaminoglycanes comme décrit récemment dans les neurones de rat (Dick et al., 2013).

II.3 Comment s'organise le transport des vésicules extracellulaires ?

Tout comme les mécanismes impliqués dans la genèse des EV, leurs modes de transport sont également peu élucidés. Jusqu'à maintenant, les exosomes et assimilés semblent être transportés de façon aléatoire dans l'organisme. Au sein du microenvironnement proche, celles-ci peuvent être captées et emprisonnées par la matrice extracellulaire mais aussi servir de facteur de remodelage puissant. Dans ce sens, il a été décrit que les exosomes issus d'adénocarcinomes de rat possèdent la capacité de dégrader la fibronectine, ténectine et vitronectine, fibres de la matrice extracellulaire, afin d'augmenter la motilité cellulaire (Mu et al., 2013). De manière intéressante, nous avons identifié que les protéines TIMP-1 et -2 ainsi que les MMP-1 et -9 sont fortement exprimées dans les EV de CSG (données préliminaires du laboratoire). Les vésicules sont également sécrétées dans une multitude de fluides différents : sang, lymphe, urine, LCR, salive etc., depuis différents organes ainsi qu'en provenance de tumeurs (Figure 35) (Witwer et al., 2013). Mon travail de thèse a permis de caractériser que les EV, produites par les CSG, peuvent diffuser à distance depuis le compartiment cérébral,

jusqu'au compartiment sanguin en traversant vraisemblablement la BHE (Treppe et al., en révision). Etant donné que les EV sont relativement inertes et dépourvues de cytosquelette propre, il est fort probable qu'elles soient simplement transportées de façon passive. Néanmoins, des améliorations technologiques récentes ont permis de découvrir par microscopie à force atomique, des extensions fibrillaires portées par des exosomes issus de lignées humaines de glioblastomes (Figure 25 cf. page 88). Ces structures forment une sorte de réseau interconnecté pouvant ainsi augmenter la probabilité de rencontre, mais également servir d'ancrage sur les cellules alentours. En outre, il a été démontré que les exosomes issus de lignées gliomateuses forment davantage ces nanotubes que ceux purifiés d'astrocytes humains (Sharma et al., 2014). Cette nanostructure constituerait un avantage pour leur captage par les cellules réceptrices. Jusqu'à présent, les méthodes classiques (microscopies électroniques à transmission et à balayage) de visualisation des exosomes ne permettent pas d'obtenir ce degré de détail. Ainsi, peut-être qu'à terme la majorité des exosomes pourra être décrite comme exprimant ces structures tubulaires et ainsi modifier notre vision « circulaire », et probablement simplifiée à tort, des vésicules.

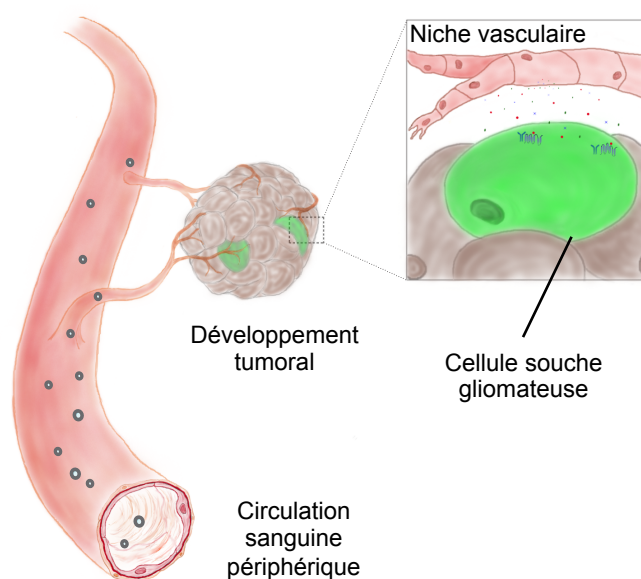


Figure 35. Dissémination des vésicules extracellulaires tumorales. La communication entre cellules souches gliomateuses et endothélium vasculaire permet la dissémination dans l'organisme des vésicules extracellulaires sécrétées par la tumeur.

III Quelles sont les retombées translationnelles ?

III.1 Les EVs sont-elles de nouveaux biomarqueurs de suivi théranostique du glioblastome ?

Le terme générique de biomarqueur peut être sous-divisé en : 1) marqueur diagnostic permettant de détecter une pathologie précise ; 2) marqueur pronostic donnant une idée de l'agressivité de la maladie ; et 3) marqueur prédictif qui informe de la réponse au traitement. Comme nous l'avons décrit, certaines mutations génétiques sont recherchées dans les biopsies de gliomes afin d'identifier le sous-type et orienter le diagnostic (Westphal and Lamszus,

2011). En revanche, actuellement aucun véritable marqueur de diagnostic, présent dans le sérum, n'existe pour le GBM. L'étude de marqueurs circulants au sein de vésicules s'avère avantageuse sur bien des points. Tout d'abord le matériel d'étude peut être facilement collecté depuis le sang circulant ou bien par ponction du LCR, et ce de façon bien moins invasive et moins risquée qu'une résection chirurgicale de la tumeur. D'autre part, les prélèvements sanguins/LCR peuvent s'effectuer de façon séquentielle, par exemple en réponse à la chimiothérapie. Dans ce sens, la phosphorylation de la protéine Tau, présente dans les exosome issus du LCR de patient, est par exemple augmentée lors de la progression de la maladie d'Alzheimer (Saman et al., 2012).

Les EV contiennent des lipides, protéines et acides nucléiques pouvant être utilisés comme biomarqueurs. Concernant les lipides, le 24S-hydroxycholesterol a initialement été mis en avant comme potentiel marqueur diagnostic de diverses pathologies neurologiques et cancer du système nerveux central (Redzic et al., 2014). Après des études approfondies, ce lipide permet maintenant de renseigner sur l'état relatif du cerveau en terme de dégénération, et est utilisé comme marqueur dans la maladie d'Alzheimer (Leoni et al., 2013).

Les protéines présentes dans les EV peuvent également être source d'information sur la tumeur, sa composition et son agressivité. La mutation de EGFRvIII est actuellement la mieux caractérisée et identifiée dans des EV issues du sérum de patients GBM (Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008). Ce variant constitutivement actif promeut un signal prolifératif et peut être l'objet d'une thérapie ciblée par le Nimotuzumab. Un suivi du niveau d'expression de EGFRvIII dans les EV représenterait alors un marqueur prédictif. En revanche, les niveaux protéiques pouvant être relativement faibles, la plupart des études actuelles privilégient l'analyse des transcrits *EGFRvIII*. L'avantage majeur de l'étude des acides nucléiques est la possibilité d'amplifier le signal, lorsque celui-ci est à la limite de la détection du point de vue protéique. Par exemple, nous avons pu identifier par RT-PCR la présence de variant muté d'*EGFR* dans des EV purifiées de lignée gliomateuse U87 et à partir d'EV du sang circulant de certains patients GBM (données préliminaires du laboratoire). La plupart des études actuelles étudiant EGFRvIII ne se base que sur des cohortes relativement restreintes (une vingtaine de patients tout au plus), si bien qu'un candidat émergent d'études cliniques plus larges est nécessaire (Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008).

Une technologie récente basée sur la technique de polymérisation en chaîne BEAMing (*Beads Emulsion Amplification Magnetics*) et associée à une puce microfluidique permet d'isoler les exosomes (Figure 36) (Shao et al., 2015). Cette approche nommée iMER (*immuno-Magnetic Exosome RNA*) permet d'analyser *ex vivo* le contenu des EV qui reflètent les propriétés de

résistance au TMZ. Le TMZ est un agent alkylant qui induit la formation de O⁶-methylguanine, adduit reconnu et réparé par la MGMT (*O⁶-MethylGuanine-DNA-MethylTransferase*) et l'APNG (*AlkylPurine-DNA-N-Glycosylase*). De façon intéressante, l'expression de ces deux protéines est corrélée à une résistance au TMZ, alors que la méthylation de leur promoteur est associée à une meilleure réponse au traitement (Agnihotri et al., 2012; Nakano, 2015). Ainsi, l'analyse d'EV de patients GBM révèle que les taux de transcrits *MGMT* et *APNG* restent relativement stables chez les patients non répondeurs au TMZ, alors qu'ils sont drastiquement diminués chez ceux qui y sont sensibles (Shao et al., 2015). Ainsi, cette

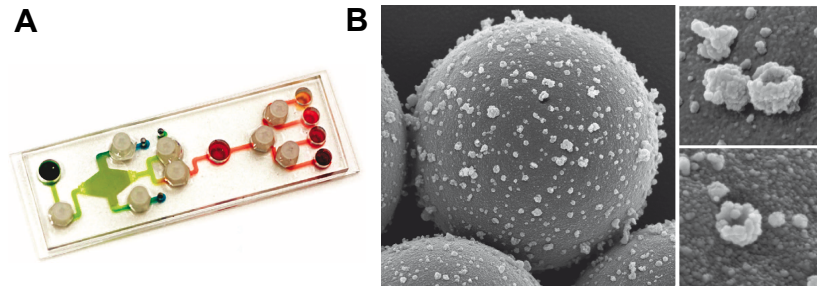


Figure 36. Technologie d'analyse des exosomes par iMER: immuno-Magnetic Exosome RNA. **A.** La puce microfluidique iMER permet de capturer les exosomes, présents dans une solution, grâce à des microbilles magnétiques de 3 nm de diamètre couplées à des anticorps (*i.e.* CD63, EGFRvIII). **B.** Analyse de ces microbilles par microscopie électronique à balayage, de nombreux exosomes sont présents à leur surface. Par la suite ces exosomes sont lysés, l'ARN contenu extrait et enfin analysé par une étape de RT-qPCR. (D'après Shao et al., 2015).

nouvelle technique iMER apparaît suffisamment sensible pour étudier, à partir d'échantillons de routine (prise de sang), les ARNm et miARN tels que les miR-21 et -128 surexprimés dans les EV circulantes de patient GBM (Nakano, 2015).

Dans notre étude, l'expression de la Séma3A au sein des EV de CSG induit une forte perméabilité vasculaire *ex vivo* et *in vivo*. De plus, son expression est largement diminuée dans les EV issues de CSG différenciées, et faiblement exprimée par la lignée gliomateuse U87. La Séma3A pourrait ainsi contribuer aux œdèmes péri-tumoraux, préjudiciables pour le patient, et donc cible potentielle en association avec le traitement classique aux corticoïdes (Dexaméthasone). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au sein du GBM, l'expression de la Séma3A est relativement restreinte à la population souche cancéreuse et qu'un haut taux de cette protéine dans les EV du sang périphérique signifierait un développement de CSG. En revanche, des résultats préliminaires de notre laboratoire indiquent que la Séma3A ne serait pas restreinte au GBM, mais également sécrétée dans les EV circulantes émanant des xénogreffes ectopiques de souris implantées avec des cellules de carcinome squameux SCC25. Pour finir, il serait intéressant d'effectuer une étude longitudinale et d'analyser son niveau d'expression dans des EVs de patients au moment du diagnostic, après la chirurgie, au

cours du cycle de radiochimiothérapie de Stupp, et durant la phase de récurrence, afin de déterminer si la Séma3A peut être considérée comme un marqueur théranostique.

III.2 Vers de nouvelles stratégies pour contrecarrer les vésicules extracellulaires

L'émergence récente des EVs fait qu'actuellement, peu de stratégies pour les combattre sont envisagées. Néanmoins, plusieurs approches peuvent être proposées pour limiter l'action des EVs : interférer avec le ciblage des cellules cibles, modifier leur contenu ou abroger leur synthèse. Dans le dernier cas, une étude a découvert que miR-1 est constamment réprimé dans les glioblastomes de haut grade, par comparaison aux astrocytes et à la neuroglie. D'autre part, l'expression stable de miR-1 provoque une réduction du volume et de la vascularisation de xénogreffes de U87, implantées en ectopique et orthotopique (Bronisz et al., 2014). Des analyses *in vitro* subséquentes démontrent que les cellules exprimant miR-1 arborent un potentiel migratoire ainsi qu'une capacité d'auto-renouvellement réduite. En outre, le miR-1 peut être transmis par transport vésiculaire extracellulaire aux cellules alentours, et possède la capacité de cibler et dégrader l'ARNm codant pour l'Annexine 2, constituant majeur des EVs de glioblastome (Bronisz et al., 2014). Le fait que les patients dont l'expression de l'Annexine 2 est dérégulée présentent une meilleure probabilité de survie, indique qu'une thérapie par réexpression de miR-1 dans les cellules gliomateuses pourrait être bénéfique, d'autant plus que le miARN pourrait être transmis et sécrété via les EVs.

Le ciblage direct des cellules réceptrices des EVs est également une piste à explorer. Des travaux de l'équipe de J. Skog ont montré que l'action de l'héparine, un glycosaminoglycane à action anticoagulante, peut prévenir l'entrée des EV dans les cellules cibles. En effet, les EVs purifiées de cellules gliomateuses de patients, U87, HUVEC ou HEK-293T, et marquées par le PKH-67 (marqueur lipophile membranaire) atteignent de façon moins efficace leurs homologues cellulaires en présence d'héparine (Atai et al., 2013). En outre, comme on l'a vu précédemment, l'ARNm EGFRvIII peut être transféré via les EVs (Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008); et un traitement des cellules cibles par l'héparine diminue significativement l'entrée de ce transcrit muté (Atai et al., 2013).

Enfin, une modification du contenu des EV pourrait également être envisagée à long terme. En effet, nous avons décrit précédemment que l'enrichissement des vésicules serait un processus sélectif impliquant de nombreux partenaires et modifications protéiques. Lorsque ces mécanismes seront bien appréhendés, nous pouvons imaginer que l'inhibition d'une protéine impliquée dans l'adressage de protéine oncogénique ou de facteurs addictifs non-

oncogènes pourrait empêcher la sécrétion de cette dernière. De même, les protéines vésiculaires peuvent directement être la cible de traitement comme décrit pour le cas de Dicer, inhibé par électroporation d'anticorps bloquant (Melo et al., 2014). Actuellement ces approches semblent rester dans le domaine de la fiction mais la création de nouveaux vecteurs thérapeutiques et l'amélioration des connaissances concernant la biogenèse des EV pourraient permettre de cibler spécifiquement ces convoyeurs.

III.3 Vers une normalisation de la perméabilité vasculaire ?

Plusieurs études *in vivo* ont montré qu'une surexpression de la Séma3A permet de réduire le développement tumoral ainsi que la densité vasculaire (Casazza et al., 2011; Maione et al., 2009). En revanche, l'analyse fine des vaisseaux tumoraux apporte des résultats divergents selon le modèle considéré. Dans l'étude de F. Maione et E. Giraudo, l'induction par adénovirus de l'expression de Séma3A dans des tumeurs pancréatiques engendre des vaisseaux tumoraux à morphologie relativement normale, et notamment un meilleur recouvrement par les péricytes et cellules musculaires. En outre, ce phénomène de normalisation vasculaire induit par la Séma3A permet de contrecarrer les mécanismes de résistance développés après un traitement anti-angiogénique prolongé (Maione et al., 2012; Maione et al., 2009). En revanche, dans les travaux d'A. Casazza et L. Tamagnone, la délivrance systémique de Séma3A réduit la maturation des vaisseaux de carcinomes mammaires (Casazza et al., 2011). Ces divergences peuvent être expliquées par la méthodologie employée (sécrétion locale vs. systémique) et donc la quantité de Séma3A qui accède réellement aux vaisseaux tumoraux afin de contrebalancer les facteurs pro-angiogéniques. De façon intéressante, la Séma3A pourrait agir selon un mode biphasique. En effet, une faible expression de la Séma3A induit une diminution de la migration de U87 au même titre qu'une surexpression, tandis que des taux médians induisent la migration cellulaire (Bagci et al., 2009). Ainsi, de la même façon que la migration cellulaire, les processus de normalisation vasculaire pourraient être modulés en fonction du taux de Séma3A atteignant l'endothélium tumoral.

Dans la plupart des cancers, la Séma3A est initialement sécrétée de façon paracrine par les cellules endothéliales dans des lésions préumorales, puis réprimée entre autre par HMGB1, au cours du *switch* angiogénique et de la progression tumorale (Chakraborty et al., 2012; Mishra et al., 2015). Selon le contexte, et par régulation stricte de la quantité de Séma3A

délivrée, une réexpression de ce facteur anti-angiogénique pourrait alors bloquer la formation de nouveaux vaisseaux immatures, et induire une maturation des vaisseaux restants.

En revanche, l'action pro-perméabilité de la Séma3A indique que sa surexpression pourrait également avoir des effets néfastes concernant par exemple les œdèmes tumoraux, l'angiogenèse et la délivrance de médicaments. Ainsi, un ciblage de la Nrp-1, à la croisée entre le VEGF et la Séma3A, pourrait alors bloquer à la fois l'induction de la perméabilité vasculaire, mais aussi l'effet du VEGF tumoral. De plus, une inhibition de ce corécepteur abroge la migration des macrophages pro-angiogéniques et pro-inflammatoires vers le cœur nécrotique tumoral (Casazza et al., 2013). En outre, dans un modèle de cancer pulmonaire, il a été montré que la surexpression de Nrp-1 augmente la croissance tumorale, via la stimulation d'une voie de sécrétion autocrine de VEGF et l'activation en aval des voies de signalisation PI3K et MAPK (Barr et al., 2015). Inversement, une suppression de l'expression de la Nrp-1 dans des cellules initiatrices cancéreuses de la peau, bloque l'autorenouvellement autocrine de ces cellules par le VEGF, ainsi que le développement angiogénique de façon paracrine (Beck et al., 2011). Dans les gliomes de haut grade, l'expression de la Nrp-1 est corrélée à un pronostic de survie plus sombre et une croissance tumorale plus importante (Hu et al., 2007). Dans ce sens, deux essais cliniques de phase I sont en cours de recrutement dans lesquels un anticorps anti-Nrp-1 seul (Weekes et al., 2014) ou associé au Bevacizumab et Paclitaxel (Patnaik et al., 2014) sera testé dans des tumeurs solides.

La communication entre CSG et cellules endothéliales au sein de la niche vasculaire du GBM apparaît centrale à la tumorigenèse et à l'angiogenèse *de novo*. Bloquer leurs moyens de communication au travers des EV, ou bien empêcher l'action spécifique de certains facteurs solubles permettrait de retrouver un état d'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ceci combiné aux thérapies classiques actuelles pourrait conduire à la destruction de la niche vasculaire tumorale, microenvironnement indispensable à la survie des CSG liées à l'initiation, la récurrence et l'agressivité des GBM. Enfin, utiliser les EV dérivées de la communication cellulaire entre CSG et microenvironnement à notre avantage comme identification de biomarqueurs théranostiques constituerait en un compagnon de diagnostic innovant.

Annexes

Communications scientifiques

❖ *Présentation orale:*

L. Treps and J. Gavard. Extracellular-vesicles secreted from glioblastoma stem-like cells as modulators of endothelial biology and potential biomarker. ADELIH Congress: Tumour microenvironment and niche. Paris, France, Octobre 2014. Prix de la meilleure communication orale.

❖ *Présentations posters*

E., Galan-Moya, **L., Treps** et J., Gavard. Controlling the communication between endothelial cells and tumor initiating cells as a new therapeutic approach against glioblastoma FEBS/EMBO, Paris, France, Septembre 2014. Prix du meilleur poster.

B., Even, **L., Treps**, A., Schmitt, S., Mistou, G., Chiocchia et L., Tourneur. FADD, a new protein with unconventional secretion under the control of the NALP3 inflammasome. The International Symposium on Mechanisms of Innate Immunity, Cell Death and Inflammation (ICDI symposium). Ghent, Belgique, Septembre 2014.

L. Treps et J. Gavard. Extracellular-vesicles secreted from glioblastoma stem-like cells as modulators of endothelial biology and potential biomarker. 5^{ème} Congrès de la société française d'angiogenèse (SFA). Chamonix, France, Avril 2014. Prix du meilleur poster.

L. Treps et J. Gavard. Cancer stem-like cells secrete Sema3A trapped in microvesicles to modulate endothelial biology. EMBO Workshop: Semaphorin function and mechanism of action. Cernay-la-ville, France, Octobre 2013.

L. Treps et J. Gavard. Cancer stem-like cell secreted microvesicles modulate endothelial permeability. Gordon Research Conference: Cell Contact and Adhesion. Lucca, Italie, Juin 2013.

Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation

Armelle Le Guelte^{1,2,3}, Eva-Maria Galan-Moya^{1,2,3}, Julie Dwyer^{1,2,3}, Lucas Treps^{1,2,3}, Garance Kettler^{1,2,3}, Jagoda K. Hebda^{1,2,3}, Sonia Dubois⁴, Cedric Auffray^{1,2,3}, Herve Chneiweiss^{3,5}, Nicolas Bidere⁴ and Julie Gavard^{1,2,3,*}

¹Cnrs, UMR8104, and ²Inserm, U1016, 22 rue Mechain, 75014 Paris, France

³Universite Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, 6 rue de l'Ecole de Medecine, 75006 Paris, France

⁴Inserm, U1014, 14 rue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif, France

⁵Inserm, U894, 2 ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France

*Author for correspondence (julie.gavard@inserm.fr)

Accepted 10 May 2012

Journal of Cell Science 125, 4137–4146

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.108282

Summary

VE-cadherin-mediated cell–cell junction weakening increases paracellular permeability in response to both angiogenic and inflammatory stimuli. Although Semaphorin 3A has emerged as one of the few known anti-angiogenic factors to exhibit pro-permeability activity, little is known about how it triggers vascular leakage. Here we report that Semaphorin 3A induced VE-cadherin serine phosphorylation and internalisation, cell–cell junction destabilisation, and loss of barrier integrity in brain endothelial cells. In addition, high-grade glioma-isolated tumour-initiating cells were found to secrete Semaphorin 3A, which promoted brain endothelial monolayer permeability. From a mechanistic standpoint, Semaphorin 3A impinged upon the basal activity of the serine phosphatase PP2A and disrupted PP2A interaction with VE-cadherin, leading to cell–cell junction disorganization and increased permeability. Accordingly, both pharmacological inhibition and siRNA-based knockdown of PP2A mimicked Semaphorin 3A effects on VE-cadherin. Hence, local Semaphorin 3A production impacts on the PP2A/VE-cadherin equilibrium and contributes to elevated vascular permeability.

Key words: VE-cadherin, Cell–cell junction, Internalisation, Plexin, Glioma stem cell

Introduction

Endothelial cells that line the inner side of blood vessels tightly regulate vascular integrity and homeostasis. Cell–cell junction leakiness is believed to orchestrate the paracellular pathway, which allows plasma molecules and cells to pass between endothelial cells (Vestweber et al., 2009). Two cell–cell junction proteins, VE-cadherin and claudin-5, are essential for ensuring vascular integrity (Taddei et al., 2008). VE-cadherin belongs to a conserved family of calcium-dependent homophilic adhesion proteins, and is a fundamental constituent of adherens junctions. Indeed, VE-cadherin forms a molecular bond connecting the extracellular space, the plasma membrane and the intracellular cytoskeleton (Dejana, 2004). Its pivotal role in vascular integrity and angiogenesis is supported by the embryonic lethality observed in VE-cadherin knockout mice as a result of vascular insufficiency (Carmeliet et al., 1999). Conversely, vascular permeability is circumvented by VE-cadherin adhesion during the course of adult neovascularisation or in response to inflammation (Schulte et al., 2011; Crosby et al., 2005). Coordinated disruption of VE-cadherin adhesive function through dual tyrosine and serine phosphorylation, internalisation, and mechanical forces, converges on cell–cell junction weakening and vascular leakage (Eliceiri et al., 1999; Gavard, 2009; Gavard and Gutkind, 2006; Murakami et al., 2008; Stockton et al., 2004). Vascular permeability is frequently elevated under diverse pathological conditions including cancer, and serves notably as a diagnostic and prognostic parameter in brain tumours

(Sorensen et al., 2009). Indeed, remodelling of VE-cadherin-based junctions has been observed within the tumour microenvironment, ultimately corroborating with tumour growth, vascularisation and spreading (Le Guelte et al., 2011; Dwyer et al., 2011; Lin et al., 2007; Weis et al., 2004).

Recently, the semaphorin guidance molecules have been proposed to regulate endothelial migration and tumour angiogenesis by providing both repulsive and attractive signals (Serini et al., 2009). Endothelial type A/D Plexins (Plx), and Neuropilins (NRP-1 and NRP-2), which are co-opted by vascular endothelial growth factor (VEGF), serve as transducer and binding receptors, respectively. Notably, class III semaphorins including, Semaphorins 3A to G, share the unique ability to hamper vascular formation and tumour vascularisation (Gaur et al., 2009). Although PlxA1 and NRP-1 likely convey Semaphorin 3A (S3A) anti-angiogenic actions in endothelial cells, the downstream intracellular signalling mechanisms remain hypothetical. It was proposed that S3A stimulation might shift NRP-1 association with VEGF-R2 to the Plx pool (Acevedo et al., 2008; Guttmann-Raviv et al., 2007). Under these conditions, S3A attenuates VEGF-R2-based angiogenesis, and yet, does not subvert all VEGF signalling function. Accordingly, S3A and VEGF cooperate to induce vascular permeability and enhance VE-cadherin tyrosine phosphorylation (Acevedo et al., 2008). Consistently, S3A overexpression reduces both pericyte coverage of tumour vessels and metastasis (Casazza et al., 2011). A role for S3A in tumour

Emerging roles of Semaphorins in the regulation of epithelial and endothelial junctions

Lucas Treps,^{1,2,3} Armelle Le Guelte^{1,2,3} and Julie Gavard^{1,2,3,*}

¹CNRS; UMR8104; Paris, France; ²Inserm; U1016; Paris, France; ³Université Paris Descartes; Sorbonne Paris Cité; Paris, France

Keywords: cadherin, tight junction, permeability, barrier, semaphorin

Tissue barriers maintain homeostasis, protect underlying tissues, are remodeled during organogenesis and injury and limit aberrant proliferation and dissemination. In this context, endothelial and epithelial intercellular junctions are the primary targets of various cues. This cellular adaptation requires plasticity and dynamics of adhesion molecules and the associated cytoskeleton, as well as the adhesive-linked signaling platforms. It is therefore not surprising that the guidance molecules from the Semaphorin family arise as novel modifiers of epithelia and endothelia in development and diseases. This review will focus on the actions of Semaphorins, and their cognate receptors, Plexins and Neuropilins, on epithelial and endothelial barrier properties.

Historically characterized for their roles in the developing central nervous system (CNS), Semaphorins have emerged as multifaceted guidance proteins that control biological responses in the epithelia and endothelia under physiological and pathological circumstances. In this review, we discuss their influence and mode of action in the regulation of tissue barriers, especially at the level of intercellular junctions.

Vertebrate Semaphorins and their Receptors

Semaphorins were identified more than 20 years ago as proteins, which provide a wide repertoire of attractive and repulsive signals that orchestrate axon outgrowth.^{1,2} A large number of these guidance molecules combines with multiple receptors and co-receptors, increasing thereby both specificity and complexity of the Semaphorin mode of action (Fig. 1). Therefore, the elucidation of signaling cascades activated by these molecules is the subject of intense research.

Semaphorins. In vertebrates, there are 20 semaphorin genes,² sub-divided into classes III–VII. Class III semaphorins (Sema3A–G) are secreted, while Semaphorins from sub-classes IV–VI exist as transmembrane proteins and Sema7A contains a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Each Semaphorin possesses a 500 amino acid extracellular domain,

called semaphorin (sema) composed of a seven-bladed β propeller domain, essential for signaling. This domain is followed by a cysteine-rich domain (PSI), involved in receptor binding ability.³ Conversely, the C-terminal tail features additional sequence motifs that diverge among classes: class III contains both an immunoglobulin-like and a basic residue-rich domains, whereas class V are distinguished by thrombospondin repeats⁴ (Fig. 1). Semaphorins co-opt two kinds of transmembrane receptors (Plexins and Neuropilins), which mediate downstream signaling.

Plexins. Plexins are the main cell surface receptors for Semaphorin signal transduction. Plexins comprise nine members in mammals and are subdivided into four classes: class A (A1–4), class B (B1–3), PlexinC1 and PlexinD1⁵ (Fig. 1). Unlike Semaphorins, Plexin architecture is conserved throughout the family. The extracellular region is composed by one sema domain and two or three PSI and IPT (immunoglobulin shared by Plexins and transcription factors) repeats. Class III and VI Semaphorins mainly bind to PlexinA. Most of the class III Semaphorins requires a co-receptor from the Neuropilin family (NRP, see paragraph 1.3), while the class VI Semaphorins directly interact with PlexinA through their respective sema domains, which in turn conveys intracellular signaling.⁵ The Plexin cytoplasmic region contains a Rho and Ras-family-specific GTPase-activating protein (GAP) domain.^{6,7} Although several models have been proposed, the exact role of the Ras-GAP activity in Semaphorin signaling remains obscure.^{5,8,9} However, it has recently been characterized that this GAP domain can be activated by dimerization after Semaphorin binding to Plexin ectodomains.¹⁰ This process could in turn inhibit Rap GTP-binding proteins and affect downstream pathways. Additionally, Plexins B and D bear PDZ (post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) and zonula occludens-1 protein (ZO-1))-binding motifs that are most likely involved in protein-protein interactions and downstream signaling.

Neuropilins. The Neuropilin receptors, namely NRP-1 and -2 are only found in vertebrates, where they exist as multiple isoforms, including soluble ones. They operate as receptors or co-receptors for diverse ligands, ranging from class III Semaphorins, heparin-binding proteins and growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor 2 (FGF) and placental growth factor 2 (PIGF).^{11–13} These single transmembrane proteins include five extracellular domains and a short cytoplasmic tail. Their extracellular region contains two complement-like⁶ (CUB) domains, also designated $\alpha 1$ and $\alpha 2$

*Correspondence to: Julie Gavard; Email: julie.gavard@inserm.fr

Submitted: 11/22/12; Revised: 12/11/12; Accepted: 12/13/12

Citation: Treps L, Le Guelte A, Gavard J. Emerging roles of Semaphorins in the regulation of epithelial and endothelial junctions. Tissue Barriers 2013; 1:e23272; <http://dx.doi.org/10.4161/tisb.23272>

Endothelial Secreted Factors Suppress Mitogen Deprivation-Induced Autophagy and Apoptosis in Glioblastoma Stem-Like Cells

Eva Maria Galan-Moya^{1,2,3}, Lucas Treps^{1,2,3}, Lisa Oliver^{4,5,6,7,8}, Hervé Chneiweiss^{9,10,11}, François M. Vallette^{4,5,6,7,8}, Nicolas Bidère^{8,12,13}, Julie Gavard^{1,2,3*}

1 UMR 8104, Centre National pour la Recherche Scientifique, Paris, France, **2** U1016, Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Paris, France, **3** Sorbonne Paris Cite, Université Paris Descartes, Paris, France, **4** UMR 892, Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Nantes, France, **5** UMR 6299, Centre National pour la Recherche Scientifique, Nantes, France, **6** Faculte de Medecine, Université de Nantes, Nantes, France, **7** Institut de Cancerologie de l'Ouest, Nantes, France, **8** Equipe Labellisee Ligue contre le Cancer, Paris, France, **9** UMRS 1130 Neurosciences Paris Seine, Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Paris, France, **10** UMR 8246, Centre National pour la Recherche Scientifique, Paris, France, **11** UMR18, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **12** UMR_S1014, Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale, Villejuif, France, **13** Université Paris-Sud P11, Orsay, France

Abstract

Rapidly growing and highly vascularized tumors, such as glioblastoma multiforme, contain heterogeneous areas within the tumor mass, some of which are inefficiently supplied with nutrients and oxygen. While the cell death rate is elevated in such zones, tumor cells are still suspected to grow and survive independently of extracellular growth factors. In line with this, glioblastoma stem-like cells (GSCs) are found closely associated with brain vasculature *in situ*, and as such are most likely in a protected microenvironment. However, the behavior of GSCs under deprived conditions has not been explored in detail. Using a panel of 14 patient-derived GSCs, we report that *ex vivo* mitogen deprivation impaired self-renewal capability, abolished constitutive activation of the mTor pathway, and impinged on GSC survival via the engagement of autophagic and apoptotic cascades. Moreover, pharmacological inhibition of the mTor pathway recapitulated the mitogen deprivation scenario. In contrast, blocking either apoptosis or autophagy, or culturing GSCs with endothelial-secreted factors partly restored mTor pathway activation and rescued GSC survival. Overall, our data suggest that GSCs are addicted to mTor, as their survival and self-renewal are profoundly dependent on this signaling axis. Thus, as mTor governs the fate of GSCs under both deprivation conditions and in the presence of endothelial factors, it could be a key target for therapeutic purposes.

Citation: Galan-Moya EM, Treps L, Oliver L, Chneiweiss H, Vallette FM, et al. (2014) Endothelial Secreted Factors Suppress Mitogen Deprivation-Induced Autophagy and Apoptosis in Glioblastoma Stem-Like Cells. PLoS ONE 9(3): e93505. doi:10.1371/journal.pone.0093505

Editor: Triantafyllos Chavakis, University Dresden, Germany

Received: January 10, 2014; **Accepted:** March 4, 2014; **Published:** March 28, 2014

Copyright: © 2014 Galan-Moya et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by Ligue Nationale Contre le Cancer, Association des NeuroOncologues d'Expression Française (ANOCEF), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Agence Nationale pour la Recherche Programme Jeunes Chercheuses-Jeunes Chercheurs (ANR JCJC), Institut National du Cancer (INCA 6508) and by a Marie Curie International Reintegration Grant within The Seventh Framework Program. EMGM is supported by a post-doctoral fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer and LT is supported by doctoral fellowship from Université Paris Descartes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: julie.gavard@inserm.fr

Introduction

Adult glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor. Patients with malignant glioma have poor prognosis due to local recurrence. Despite surgery, radiotherapy and temozolomide chemotherapy, less than 10% of patients reach a 5-year survival [1]. GBMs comprise a subpopulation of cells, which retain the ability to expand *ex vivo* as neurospheres in mitogen-defined medium and recapitulate tumor formation in mice [2,3]. These so-called glioblastoma stem-like cells (GSCs) share many characteristics with normal stem cells, including self-renewal and multipotency [3]. One major mechanism that eliminates undesired and potentially toxic cells is apoptosis [4]. However, whether apoptosis contributes to limit stem cell expansion has not been completely elucidated. For instance, we have shown that adult human mesenchymal stem cells do not undergo apoptosis when left undifferentiated [5]. Moreover, the

impact of apoptosis on stem cells and cancer stem-like cells during tissue regeneration and tumor progression is not known. The manipulation of autophagy has also been suggested as a valuable strategy to prevent cancer development, limit tumor progression and increase the efficacy of cancer treatments [6]. Therefore, while GBMs are generally resistant to therapies that induce apoptosis, they might be more sensitive to those targeting autophagy [7]. However, the molecular mechanisms governing the interplay between autophagy and apoptotic cell death in GSCs remain to be elucidated.

Although neo-angiogenesis is believed to overcome growing tumor needs, inner zones within the tumor mass are not always efficiently irrigated and an increase in the tumor cell death rate can occur as a consequence of starved conditions [8]. Likewise, penury can be provoked upon administration of chemotherapeutic and anti-angiogenic agents. Indeed, GSCs can be suppressed along with tumor endothelial cells in response to anti-vascular

SHORT REPORT

Open Access

The guanine exchange factor SWAP70 mediates vGPCR-induced endothelial plasticity

Julie Dwyer^{1,2,3}, Sandy Azzi^{1,2,3}, Héloïse M Leclair^{1,2,3}, Steven Georges^{1,2,3}, Agnès Carlotti⁴, Lucas Treps^{1,2,3}, Eva M Galan-Moya^{1,2,3}, Catherine Alexia⁵, Nicolas Dupin^{1,2,3,6}, Nicolas Bidère^{1,2,3} and Julie Gavard^{1,2,3*}

Abstract

Background: The viral G protein-coupled receptor (vGPCR) is proposed to act as one of the predominant mediators of Kaposi's sarcoma (KS), a human herpes virus 8 (HHV8)-elicited disease. The actions of vGPCR manifest pathogenesis, in part, through increased permeability of endothelial cells. Endothelial cell-cell junctions have indeed emerged as an instrumental target involved in the vasculature defects observed within the tumor microenvironment. The pathway leading to adherens junction destabilization has been shown to involve the activation of the small GTPase Rac, in the context of either latent infection or the sole expression of vGPCR. However, the precise molecular mechanisms governed by vGPCR in vascular leakage require further elucidation.

Findings: Guanine exchange factors (GEFs) function as critical molecular switches that control the activation of small GTPases. We therefore screened the effects of 80 siRNAs targeting GEFs on vGPCR-driven endothelial permeability and identified switch-associated protein 70 (SWAP70) as necessary for its elevating effects. Pull-down experiments further showed that Rac activation by vGPCR was dependent on SWAP70. Examination of tissues and cells from HHV8-positive patients revealed that SWAP70 was ubiquitously expressed. Furthermore, SWAP70 was found to be crucial for vGPCR-driven endothelial tube formation and endothelial sprouting *in vitro*.

Conclusions: SWAP70 appears to act as a molecular intermediate between vGPCR and endothelial activation. Because of the important role of vGPCR-mediated endothelial plasticity in KS pathogenesis, inhibition of SWAP70 function could be of interest for blocking vGPCR-driven activities in HHV8-defined diseases.

Keywords: Angiogenesis, Human herpes virus 8, Kaposi sarcoma herpes virus, Permeability, Rac, Small GTPases

Findings

Of the multiple genes encoded by the human herpes virus 8 (HHV8), the viral G protein-coupled receptor (vGPCR) is one of the key instigators of Kaposi's sarcoma (KS) pathogenesis [1]. vGPCR indeed exhibits pleiotropic actions in the manifestation of diseases such as KS and primary effusion lymphoma (PEL), among which are paracrine transformation and endothelial defects [2-7]. This constitutively active homologue of the IL-8 chemokine receptor CXCR2 initiates and propagates a KS-like phenotype in mice engineered to express the gene in an endothelial-restricted manner [2,8,9]. From a molecular standpoint, we have previously demonstrated that vGPCR exploits the IL-8 pro-permeability

pathway, which involves the activation of the small GTPase Rac [4,10,11]. In line with this, Rac signaling has been reported to act upstream of endothelial permeability in latently infected-endothelial cells [6]. Moreover, Rac also controls vGPCR-mediated chemokine and pro-angiogenic secretion [12], therefore placing Rac at the cornerstone of vGPCR molecular piracy. Consequently, interruption of vGPCR/Rac actions could hamper disease progression in HHV8-infected individuals. However, how vGPCR orchestrates Rac activation in endothelial cells is unknown.

We aimed to identify molecular switches involved in Rac-dependent vGPCR-driven endothelial permeability. Because vGPCR hijacks IL-8-induced intracellular signaling pathways [1,4,10], we wanted to unmask GEFs that could contribute to both vGPCR and IL-8 actions. We thus screened a siRNA library against Rho family GEFs, which includes Rac GEFs, to pinpoint those required for

* Correspondence: julie.gavard@inserm.fr

¹CNRS, UMR8104, 22 rue Mechain, 75014 Paris, France

²INSERM, U1016, 22 rue Mechain, 75014 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders

Sandra Blanco¹, Sabine Dietmann¹, Joana V Flores¹, Shobbir Hussain¹, Claudia Kutter², Peter Humphreys¹, Margus Lukk², Patrick Lombard¹, Lucas Treps³, Martyna Popis¹, Stefanie Kellner⁴, Sabine M Hölter^{5,6}, Lillian Garrett^{5,6}, Wolfgang Wurst^{5,6,7}, Lore Becker^{5,8}, Thomas Klopstock^{7,9}, Helmut Fuchs^{5,8}, Valerie Gailus-Durner^{5,8}, Martin Hrabě de Angelis^{5,8}, Ragnhildur T Káradóttir¹, Mark Helm⁴, Jernej Ule¹⁰, Joseph G Gleeson¹¹, Duncan T Odom² & Michaela Frye^{1,*}

Abstract

Mutations in the cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 cause microcephaly and other neurological abnormalities in mice and human. How post-transcriptional methylation contributes to the human disease is currently unknown. By comparing gene expression data with global cytosine-5 RNA methylomes in patient fibroblasts and NSun2-deficient mice, we find that loss of cytosine-5 RNA methylation increases the angiogenin-mediated endonucleolytic cleavage of transfer RNAs (tRNA) leading to an accumulation of 5' tRNA-derived small RNA fragments. Accumulation of 5' tRNA fragments in the absence of NSun2 reduces protein translation rates and activates stress pathways leading to reduced cell size and increased apoptosis of cortical, hippocampal and striatal neurons. Mechanistically, we demonstrate that angiogenin binds with higher affinity to tRNAs lacking site-specific NSun2-mediated methylation and that the presence of 5' tRNA fragments is sufficient and required to trigger cellular stress responses. Furthermore, the enhanced sensitivity of NSun2-deficient brains to oxidative stress can be rescued through inhibition of angiogenin during embryogenesis. In conclusion, failure in NSun2-mediated tRNA methylation contributes to human diseases via stress-induced RNA cleavage.

Keywords 5-methylcytidine; Misu; NSun2; RNA modification

Subject Categories Molecular Biology of Disease; Neuroscience; RNA Biology

DOI 10.15252/embj.201489282 | Received 16 June 2014 | Accepted 23 June 2014 | Published online 25 July 2014

The EMBO Journal (2014) 33: 2020–2039

See also: G Stoecklin & S Diederichs (September 2014)

Introduction

Hereditary forms of intellectual disability (ID) are neuro-developmental disorders with a worldwide prevalence of around 2% (Ropers, 2008; de Ligt *et al*, 2012). Several genetic mutations in the NSUN2 gene have been identified to cause a syndromic form of intellectual disability and a Dubowitz-like syndrome in humans (Abbasi-Moheb *et al*, 2012; Khan *et al*, 2012; Martinez *et al*, 2012). In individuals with the Dubowitz-like syndrome, the NSUN2 gene carries a homozygous mutation in the canonical splice acceptor site of exon 6 leading to a truncation of the transcribed mRNA and loss of the NSun2 protein (Martinez *et al*, 2012). Besides ID, the patients show further symptoms of neurological abnormalities such as microcephaly, behavioural deficits, speech delay, abnormal gait as well as morphological features including growth retardation, unusual facies and cutaneous abnormalities (Dubowitz, 1965; Huber *et al*, 2011; Martinez *et al*, 2012). While some of the morphological symptoms are also present in loss-of-function transgenic mouse models for NSun2, neurological defects have not been studied yet (Blanco *et al*, 2011). However, loss of the NSun2 orthologue in *Drosophila* causes severe short-term memory deficits (Abbasi-Moheb *et al*, 2012). It is known that NSun2 is a conserved RNA methyltransferase that modifies cytosine-5 in transfer RNAs (tRNAs) and other non-coding RNA species (Brzezicha *et al*, 2006; Frye & Watt, 2006; Blanco *et al*, 2011; Hussain *et al*, 2013b; Khoddami & Cairns, 2013), but whether and how loss of RNA methylation can cause symptoms of these complex diseases is currently unknown.

Although cytosine-5 methylation (m⁵C) is one of the best characterised epigenetic modifications found in DNA (Suzuki & Bird, 2008), the cellular and molecular functions of the same modified

1 Wellcome Trust – Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK

2 Li Ka Shing Centre, CR-UK Cambridge Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK

3 CNRS, UMR8104, Paris, France

4 Johannes Gutenberg University Mainz, Institute for Pharmacy and Biochemistry, Mainz, Germany

5 German Mouse Clinic, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

6 Institute of Developmental Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

7 German Center for Vertigo and Balance Disorders, Munich, Germany

8 Institute for Experimental Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

9 Department of Neurology, Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

10 Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK

11 Laboratory of Pediatric Brain Diseases, Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, New York, NY, USA

*Corresponding author. Tel: +44 1223 760230; Fax: +44 1223 760241; E-mails: Michaela.Frye@cancer.org.uk; mf364@cam.ac.uk

Références

Références bibliographiques

(1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 97, 551-552.

Acevedo, L. M., Barillas, S., Weis, S. M., Gothert, J. R., and Cheresch, D. A. (2008). Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* 111, 2674-2680.

Adams, R. H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 464-478.

Adams, R. H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H., and Puschel, A. W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *The EMBO journal* 16, 6077-6086.

Agnihotri, S., Gajadhar, A. S., Ternamian, C., Gorlia, T., Diefes, K. L., Mischel, P. S., Kelly, J., McGown, G., Thorncroft, M., Carlson, B. L., *et al.* (2012). Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *The Journal of clinical investigation* 122, 253-266.

Akers, J. C., Ramakrishnan, V., Kim, R., Skog, J., Nakano, I., Pingle, S., Kalinina, J., Hua, W., Kesari, S., Mao, Y., *et al.* (2013). MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PloS one* 8, e78115.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology* 10, 619-624.

Al-Shawi, M. K., and Omote, H. (2005). The remarkable transport mechanism of P-glycoprotein: a multidrug transporter. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37, 489-496.

Alcaide, P., Martinelli, R., Newton, G., Williams, M. R., Adam, A., Vincent, P. A., and Luscinskas, F. W. (2012). p120-Catenin prevents neutrophil transmigration independently of RhoA inhibition by impairing Src dependent VE-cadherin phosphorylation. *American journal of physiology Cell physiology* 303, C385-395.

Alcaide, P., Newton, G., Auerbach, S., Sehrawat, S., Mayadas, T. N., Golan, D. E., Yacono, P., Vincent, P., Kowalczyk, A., and Luscinskas, F. W. (2008). p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation. *Blood* 112, 2770-2779.

Allt, G., and Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 169, 1-11.

Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., Mahase, S., Dutta, D. J., Seto, J., Kramer, E. G., *et al.* (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation* 122, 2454-2468.

Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M. L., Kopp, N., Lee, S. C., Raine, C. S., Brosnan, C. F., and John, G. R. (2006). IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *Journal of immunology* 177, 5574-5584.

- Atai, N. A., Balaj, L., van Veen, H., Breakefield, X. O., Jarzyna, P. A., Van Noorden, C. J., Skog, J., and Maguire, C. A. (2013). Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *Journal of neuro-oncology* 115, 343-351.
- Atkinson, G. P., Nozell, S. E., Harrison, D. K., Stonecypher, M. S., Chen, D., and Benveniste, E. N. (2009). The prolyl isomerase Pin1 regulates the NF-kappaB signaling pathway and interleukin-8 expression in glioblastoma. *Oncogene* 28, 3735-3745.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., and Imhof, B. A. (2001). Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98, 3699-3707.
- Azzi, S., Hebda, J. K., and Gavard, J. (2013). Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in oncology* 3, 211.
- Bagci, T., Wu, J. K., Pfannl, R., Ilag, L. L., and Jay, D. G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* 28, 3537-3550.
- Balda, M. S., Garrett, M. D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of cell biology* 160, 423-432.
- Balda, M. S., and Matter, K. (2003). Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 13, 310-318.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., Shi, Q., McLendon, R. E., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006b). Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer research* 66, 7843-7848.
- Barr, M. P., Gray, S. G., Gately, K., Hams, E., Fallon, P. G., Davies, A. M., Richard, D. J., Pidgeon, G. P., and O'Byrne, K. J. (2015). Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor, signaling through neuropilin-1 in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer* 14, 45.
- Barshes, N., Demopoulos, A., and Engelhard, H. H. (2005). Anatomy and physiology of the leptomeninges and CSF space. *Cancer treatment and research* 125, 1-16.
- Basile, J. R., Afkhami, T., and Gutkind, J. S. (2005). Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Molecular and cellular biology* 25, 6889-6898.
- Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., *et al.* (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer cell* 11, 83-95.
- Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S. J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer research* 62, 4123-4131.
- Bauer, H. C., Krizbai, I. A., Bauer, H., and Traweger, A. (2014). "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Frontiers in neuroscience* 8, 392.

- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., Dejana, E., and Brockhaus, M. (2000). Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry* 275, 30970-30976.
- Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K. K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P. A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A., *et al.* (2011). A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 478, 399-403.
- Bell, C. H., Aricescu, A. R., Jones, E. Y., and Siebold, C. (2011). A dual binding mode for RhoGTPases in plexin signalling. *PLoS biology* 9, e1001134.
- Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* 68, 1-8.
- Bendayan, M. (2002). Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microscopy research and technique* 57, 327-349.
- Bendayan, M., and Rasio, E. A. (1997). Evidence of a tubular system for transendothelial transport in arterial capillaries of the rete mirabile. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 45, 1365-1378.
- Bendayan, R., Ronaldson, P. T., Gingras, D., and Bendayan, M. (2006). In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 54, 1159-1167.
- Bentley, K., Franco, C. A., Philippides, A., Blanco, R., Dierkes, M., Gebala, V., Stanchi, F., Jones, M., Aspalter, I. M., Cagna, G., *et al.* (2014). The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nature cell biology* 16, 309-321.
- Berg JM, T. J., Stryer L (2002). *Biochemistry*. 5th edition.: W H Freeman).
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental cell research* 292, 51-66.
- Bouillet, L., Baudet, A. E., Deroux, A., Sidibe, A., Dumestre-Perard, C., Mannic, T., Treillard, B., Arboleas, M. A., Chiquet, C. A., Gulino-Debrac, D. G., and Vilgrain, I. Y. (2013). Auto-antibodies to vascular endothelial cadherin in humans: association with autoimmune diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 93, 1194-1202.
- Bouleti, C., Mathivet, T., Coqueran, B., Serfaty, J. M., Lesage, M., Berland, E., Ardidie-Robouant, C., Kauffenstein, G., Henrion, D., Lapergue, B., *et al.* (2013). Protective effects of angiopoietin-like 4 on cerebrovascular and functional damages in ischaemic stroke. *European heart journal* 34, 3657-3668.
- Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M. O., Peruzzi, P., Ansari, K. I., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., *et al.* (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer research* 74, 738-750.
- Bulnes, S., Argandona, E. G., Bengoetxea, H., Leis, O., Ortuzar, N., and Lafuente, J. V. (2010). The role of eNOS in vascular permeability in ENU-induced gliomas. *Acta neurochirurgica Supplement* 106, 277-282.
- Burton, G. J., and Jauniaux, E. (1995). Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *British journal of obstetrics and gynaecology* 102, 818-825.

Buschow, S. I., van Balkom, B. W., Aalberts, M., Heck, A. J., Wauben, M., and Stoorvogel, W. (2010). MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunology and cell biology* 88, 851-856.

Butt, A. M., Jones, H. C., and Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology* 429, 47-62.

Cahill, D. P., Levine, K. K., Betensky, R. A., Codd, P. J., Romany, C. A., Reavie, L. B., Batchelor, T. T., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Curry, W. T., *et al.* (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2038-2045.

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer cell* 11, 69-82.

Cao, G., Fehrenbach, M. L., Williams, J. T., Finklestein, J. M., Zhu, J. X., and Delisser, H. M. (2009). Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. *The American journal of pathology* 175, 903-915.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., *et al.* (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98, 147-157.

Casazza, A., Fu, X., Johansson, I., Capparuccia, L., Andersson, F., Giustacchini, A., Squadrito, M. L., Venneri, M. A., Mazzone, M., Larsson, E., *et al.* (2011). Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 741-749.

Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., Deschoemaeker, S., Van Ginderachter, J. A., Tamagnone, L., and Mazzone, M. (2013). Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer cell* 24, 695-709.

Catalano, A., Caprari, P., Moretti, S., Faronato, M., Tamagnone, L., and Procopio, A. (2006). Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 107, 3321-3329.

Cattellino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., *et al.* (2003). The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *The Journal of cell biology* 162, 1111-1122.

Caunt, M., Mak, J., Liang, W. C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R. K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H. B., Ross, J., *et al.* (2008). Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer cell* 13, 331-342.

Cavusoglu, E., Kornecki, E., Sobocka, M. B., Babinska, A., Ehrlich, Y. H., Chopra, V., Yanamadala, S., Ruwende, C., Salifu, M. O., Clark, L. T., *et al.* (2007). Association of plasma levels of F11

receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) with human atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 50, 1768-1776.

Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., Beaudoin, F., Leboeuf, D., De Guire, V., Binet, F., *et al.* (2013). Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab* 18, 505-518.

Chakraborty, G., Kumar, S., Mishra, R., Patil, T. V., and Kundu, G. C. (2012). Semaphorin 3A suppresses tumor growth and metastasis in mice melanoma model. *PloS one* 7, e33633.

Chapouly, C., Tadesse Argaw, A., Horng, S., Castro, K., Zhang, J., Asp, L., Loo, H., Laitman, B. M., Mariani, J. N., Straus Farber, R., *et al.* (2015). Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain : a journal of neurology*.

Chen, H. L., Pistollato, F., Hoepfner, D. J., Ni, H. T., McKay, R. D., and Panchision, D. M. (2007). Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem cells* 25, 2291-2301.

Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., and Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522-526.

Chen, R., Nishimura, M. C., Bumbaca, S. M., Kharbanda, S., Forrest, W. F., Kasman, I. M., Greve, J. M., Soriano, R. H., Gilmour, L. L., Rivers, C. S., *et al.* (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer cell* 17, 362-375.

Chen, W. W., Balaj, L., Liao, L. M., Samuels, M. L., Kotsopoulos, S. K., Maguire, C. A., Loguidice, L., Soto, H., Garrett, M., Zhu, L. D., *et al.* (2013). BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Molecular therapy Nucleic acids* 2, e109.

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., *et al.* (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139-152.

Chervin-Petinot, A., Courcon, M., Almagro, S., Nicolas, A., Grichine, A., Grunwald, D., Prandini, M. H., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2012). Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with alpha-catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. *The Journal of biological chemistry* 287, 7556-7572.

Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., *et al.* (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* 370, 709-722.

Chow, L. M., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., Broniscer, A., Ellison, D. W., and Baker, S. J. (2011). Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer cell* 19, 305-316.

Chung, A. S., Lee, J., and Ferrara, N. (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 10, 505-514.

Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist* 14, 1131-1138.

- Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 255-289.
- Coma, S., Shimizu, A., and Klagsbrun, M. (2011). Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. *Cell adhesion & migration* 5, 266-275.
- Conti, A., Guli, C., La Torre, D., Tomasello, C., Angileri, F. F., and Aguenouz, M. (2010). Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. *Cancers* 2, 693-712.
- Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T. R., Leonardi, T., Alpi, E., Drago, D., Alfaro-Cervello, C., Saini, H. K., Davis, M. P., Schaeffer, J., *et al.* (2014). Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Molecular cell* 56, 193-204.
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., *et al.* (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*.
- Cowin, P., Kapprell, H. P., Franke, W. W., Tamkun, J., and Hynes, R. O. (1986). Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 46, 1063-1073.
- Cox, C. M., and Poole, T. J. (2000). Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 218, 371-382.
- Daniel, J. M., and Reynolds, A. B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology* 19, 3614-3623.
- Davis, M. A., and Reynolds, A. B. (2006). Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Developmental cell* 10, 21-31.
- de Almeida Sassi, F., Lunardi Brunetto, A., Schwartzmann, G., Roesler, R., and Abujamra, A. L. (2012). Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche. *Journal of oncology* 2012, 537861.
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., *et al.* (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651-663.
- De Jaeger, K., Kavanagh, M. C., and Hill, R. P. (2001). Relationship of hypoxia to metastatic ability in rodent tumours. *British journal of cancer* 84, 1280-1285.
- Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* 121, 2115-2122.
- Dick, G., Tan, C. L., Alves, J. N., Ehlert, E. M., Miller, G. M., Hsieh-Wilson, L. C., Sugahara, K., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T. H., Verhaagen, J., *et al.* (2013). Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *The Journal of biological chemistry* 288, 27384-27395.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., and Akhurst, R. J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845-1854.

- Dimitratos, S. D., Woods, D. F., Stathakis, D. G., and Bryant, P. J. (1999). Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21, 912-921.
- Dorfel, M. J., and Huber, O. (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 807356.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903-915.
- Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, C. R., Dewhirst, M. W., Yuan, F., and Chilkoti, A. (2006). Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 335-344.
- Dvorak, A. M., Kohn, S., Morgan, E. S., Fox, P., Nagy, J. A., and Dvorak, H. F. (1996). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *Journal of leukocyte biology* 59, 100-115.
- Dwyer, J., Azzi, S., Leclair, H. M., Georges, S., Carlotti, A., Treps, L., Galan-Moya, E. M., Alexia, C., Dupin, N., Bidere, N., and Gavard, J. (2015). The guanine exchange factor SWAP70 mediates vGPCR-induced endothelial plasticity. *Cell communication and signaling : CCS* 13, 11.
- Dwyer, J., Hebda, J. K., Le Guelte, A., Galan-Moya, E. M., Smith, S. S., Azzi, S., Bidere, N., and Gavard, J. (2012). Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PloS one* 7, e45562.
- Dwyer, J., Le Guelte, A., Galan Moya, E. M., Sumbal, M., Carlotti, A., Douguet, L., Gutkind, J. S., Grange, P. A., Dupin, N., and Gavard, J. (2011). Remodeling of VE-cadherin junctions by the human herpes virus 8 G-protein coupled receptor. *Oncogene* 30, 190-200.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R., and Baron, M. H. (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* 128, 1717-1730.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M. K., Suzuki, A., Imhof, B. A., and Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of cell science* 116, 3879-3891.
- El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J. L., Eichmann, A., *et al.* (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain : a journal of neurology* 133, 973-982.
- Elias, B. C., Suzuki, T., Seth, A., Giorgianni, F., Kale, G., Shen, L., Turner, J. R., Naren, A., Desiderio, D. M., and Rao, R. (2009). Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *The Journal of biological chemistry* 284, 1559-1569.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., and Cheresch, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular cell* 4, 915-924.
- Ellis, L. M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1099-1107.

- Famiglietti, J., Sun, J., DeLisser, H. M., and Albelda, S. M. (1997). Tyrosine residue in exon 14 of the cytoplasmic domain of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) regulates ligand binding specificity. *The Journal of cell biology* 138, 1425-1435.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y. M., Maciarczyk, J., *et al.* (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem cells* 28, 5-16.
- Fan, Y., Potdar, A. A., Gong, Y., Eswarappa, S. M., Donnola, S., Lathia, J. D., Hambardzumyan, D., Rich, J. N., and Fox, P. L. (2014). Profilin-1 phosphorylation directs angiocrine expression and glioblastoma progression through HIF-1 α accumulation. *Nature cell biology* 16, 445-456.
- Fanning, A. S., Little, B. P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., and Anderson, J. M. (2007). The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Molecular biology of the cell* 18, 721-731.
- Feng, D., Nagy, J. A., Hipp, J., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M. (1996). Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *The Journal of experimental medicine* 183, 1981-1986.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrarese, R., Harsh, G. R. t., Yadav, A. K., Bug, E., Maticzka, D., Reichardt, W., Dombrowski, S. M., Miller, T. E., Masilamani, A. P., Dai, F., *et al.* (2014). Lineage-specific splicing of a brain-enriched alternative exon promotes glioblastoma progression. *The Journal of clinical investigation* 124, 2861-2876.
- Folkman, J., Long, D. M., Jr., and Becker, F. F. (1963). Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16, 453-467.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S. L., Oh, D., Moral, L., and Shao, R. (2012). Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *The Journal of biological chemistry* 287, 24821-24831.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., and Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2604-2609.
- Funke, L., Dakoji, S., and Bretz, D. S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annual review of biochemistry* 74, 219-245.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123, 1777-1788.

- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of cell biology* 127, 1617-1626.
- Gabrusiewicz, K., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Hossain, M. B., Conrad, C. A., Aldape, K. D., Fuller, G. N., Marini, F. C., Alonso, M. M., Idoate, M. A., *et al.* (2014). Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes. *Oncotarget* 5, 2208-2220.
- Galan Moya, E. M., Le Guelte, A., and Gavard, J. (2009). PAKing up to the endothelium. *Cell Signal* 21, 1727-1737.
- Galan-Moya, E. M., Le Guelte, A., Fernandes, E. L., Thirant, C., Dwyer, J., Bidere, N., Couraud, P. O., Scott, M. G., Junier, M. P., Chneiweiss, H., and Gavard, J. (2011). Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Rep* 12, 470-476.
- Galan-Moya, E. M., Treps, L., Oliver, L., Chneiweiss, H., Vallette, F. M., Bidere, N., and Gavard, J. (2014). Endothelial secreted factors suppress mitogen deprivation-induced autophagy and apoptosis in glioblastoma stem-like cells. *PloS one* 9, e93505.
- Gandhi, N. S., Coombe, D. R., and Mancera, R. L. (2008). Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 1. Molecular modeling studies. *Biochemistry* 47, 4851-4862.
- Garnacho, C., Shuvaev, V., Thomas, A., McKenna, L., Sun, J., Koval, M., Albelda, S., Muzykantov, V., and Muro, S. (2008). RhoA activation and actin reorganization involved in endothelial CAM-mediated endocytosis of anti-PECAM carriers: critical role for tyrosine 686 in the cytoplasmic tail of PECAM-1. *Blood* 111, 3024-3033.
- Gavard, J. (2009). Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS letters* 583, 1-6.
- Gavard, J., and Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* 8, 1223-1234.
- Gavard, J., Hou, X., Qu, Y., Masedunskas, A., Martin, D., Weigert, R., Li, X., and Gutkind, J. S. (2009). A role for a CXCR2/phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling axis in acute and chronic vascular permeability. *Molecular and cellular biology* 29, 2469-2480.
- Gentil-dit-Maurin, A., Oun, S., Almagro, S., Bouillot, S., Courcon, M., Linnepe, R., Vestweber, D., Huber, P., and Tillet, E. (2010). Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin. *Experimental cell research* 316, 2587-2599.
- Gerhardt, H., Wolburg, H., and Redies, C. (2000). N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 218, 472-479.
- Giampietro, C., Taddei, A., Corada, M., Sarra-Ferraris, G. M., Alcalay, M., Cavallaro, U., Orsenigo, F., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (2012). Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood* 119, 2159-2170.
- Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* 11, 1143-1149.

- Giger, R. J., Cloutier, J. F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, D. V., Moore, S. E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F. S., *et al.* (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29-41.
- Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., *et al.* (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* 370, 699-708.
- Gilbertson, R. J., and Gutmann, D. H. (2007). Tumorigenesis in the brain: location, location, location. *Cancer research* 67, 5579-5582.
- Glen, K., Luu, N. T., Ross, E., Buckley, C. D., Rainger, G. E., Egginton, S., and Nash, G. B. (2012). Modulation of functional responses of endothelial cells linked to angiogenesis and inflammation by shear stress: differential effects of the mechanotransducer CD31. *Journal of cellular physiology* 227, 2710-2721.
- Go, H., Jang, J. Y., Kim, P. J., Kim, Y. G., Nam, S. J., Paik, J. H., Kim, T. M., Heo, D. S., Kim, C. W., and Jeon, Y. K. (2015). MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*.
- Goel, H. L., Bae, D., Pursell, B., Gouvin, L. M., Lu, S., and Mercurio, A. M. (2011). Neuropilin-2 promotes branching morphogenesis in the mouse mammary gland. *Development* 138, 2969-2976.
- Goldmann, E. E. (1909). Die aussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Farbung Beitr Klin Chir 64, 192-265.
- Gong, A. H., Wei, P., Zhang, S., Yao, J., Yuan, Y., Zhou, A., Lang, F. F., Heimberger, A. B., Rao, G., and Huang, S. (2015). FoxM1 drives a feed-forward STAT3 activation loop that promotes self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer research*.
- Gould, S. J., and Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 2.
- Grau, S., Thorsteinsdottir, J., von Baumgarten, L., Winkler, F., Tonn, J. C., and Schichor, C. (2011). Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells. *Journal of neuro-oncology* 104, 103-112.
- Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C. E., Jessell, T. M., Kolodkin, A. L., and Ginty, D. D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307, 265-268.
- Guichet, P. O., Guelfi, S., Teigell, M., Hoppe, L., Bakalara, N., Bauchet, L., Duffau, H., Lamszus, K., Rothhut, B., and Hugnot, J. P. (2015). Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem cells* 33, 21-34.
- Guo, H. F., Li, X., Parker, M. W., Waltenberger, J., Becker, P. M., and Vander Kooi, C. W. (2013). Mechanistic basis for the potent anti-angiogenic activity of semaphorin 3F. *Biochemistry* 52, 7551-7558.
- Guo, J., Shinriki, S., Su, Y., Nakamura, T., Hayashi, M., Tsuda, Y., Murakami, Y., Tasaki, M., Hide, T., Takezaki, T., *et al.* (2014). Hypoxia suppresses cylindromatosis (CYLD) expression to promote inflammation in glioblastoma: possible link to acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget* 5, 6353-6364.

- Guttmann-Raviv, N., Shrager-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O., and Neufeld, G. (2007). Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 282, 26294-26305.
- Haarmann, A., Deiss, A., Prochaska, J., Foerch, C., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P. O., Stoll, G., Rieckmann, P., and Buttmann, M. (2010). Evaluation of soluble junctional adhesion molecule-A as a biomarker of human brain endothelial barrier breakdown. *PloS one* 5, e13568.
- Hamerlik, P., Lathia, J. D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr., Fischer, W., Lukas, J., *et al.* (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *The Journal of experimental medicine* 209, 507-520.
- Hashimoto, K., Kataoka, N., Nakamura, E., Hagihara, K., Hatano, M., Okamoto, T., Kanouchi, H., Minatogawa, Y., Mohri, S., Tsujioka, K., and Kajiya, F. (2011). Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigration activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions. *International journal of cardiology* 149, 232-239.
- Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* 57, 173-185.
- He, Z., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.
- Hebda, J. K., Leclair, H. M., Azzi, S., Roussel, C., Scott, M. G., Bidere, N., and Gavard, J. (2013). The C-terminus region of beta-arrestin1 modulates VE-cadherin expression and endothelial cell permeability. *Cell communication and signaling : CCS* 11, 37.
- Herron, C. R., Lowery, A. M., Hollister, P. R., Reynolds, A. B., and Vincent, P. A. (2011). p120 regulates endothelial permeability independently of its NH2 terminus and Rho binding. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300, H36-48.
- His, W. (1900). *Lecithoblast und Angioblast der Wirbelthiere*, Vol 22: Wis. Math.-Phys).
- Holmberg Olausson, K., Maire, C. L., Haidar, S., Ling, J., Learner, E., Nister, M., and Ligon, K. L. (2014). Prominin-1 (CD133) defines both stem and non-stem cell populations in CNS development and gliomas. *PloS one* 9, e106694.
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Lofstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K., *et al.* (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer cell* 10, 413-423.
- Holness, C. L., and Simmons, D. L. (1994). Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily. *Journal of cell science* 107 (Pt 8), 2065-2070.
- Hong, B. S., Cho, J. H., Kim, H., Choi, E. J., Rho, S., Kim, J., Kim, J. H., Choi, D. S., Kim, Y. K., Hwang, D., and Ghoo, Y. S. (2009). Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC genomics* 10, 556.
- Hosking, C. R., Ulloa, F., Hogan, C., Ferber, E. C., Figueroa, A., Gevaert, K., Birchmeier, W., Briscoe, J., and Fujita, Y. (2007). The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. *Molecular biology of the cell* 18, 1918-1927.
- Hou, S. T., Nilchi, L., Li, X., Gangaraju, S., Jiang, S. X., Aylsworth, A., Monette, R., and Slinn, J. (2015). Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage. *Scientific reports* 5, 7890.

Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M. J., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., and Cheng, S. Y. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 26, 5577-5586.

Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2001a). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of biological chemistry* 276, 12301-12309.

Huber, J. D., Eggleton, R. D., and Davis, T. P. (2001b). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences* 24, 719-725.

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., and Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of development* 59, 3-10.

Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., and Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of cell biology* 171, 939-945.

Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *The Journal of cell biology* 176, 779-786.

Ilan, N., Cheung, L., Pinter, E., and Madri, J. A. (2000). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 275, 21435-21443.

Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., and McDonald, D. M. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *The American journal of pathology* 165, 35-52.

Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8, 837-845.

Iruela-Arispe, M. L., and Davis, G. E. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental cell* 16, 222-231.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147, 1351-1363.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *The Journal of cell biology* 138, 181-192.

Iwamoto, N., Higashi, T., and Furuse, M. (2014). Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell structure and function* 39, 1-8.

- Janssen, B. J., Malinauskas, T., Weir, G. A., Cader, M. Z., Siebold, C., and Jones, E. Y. (2012). Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nature structural & molecular biology* 19, 1293-1299.
- Jean, C., Chen, X. L., Nam, J. O., Tancioni, I., Uryu, S., Lawson, C., Ward, K. K., Walsh, C. T., Miller, N. L., Ghassemian, M., *et al.* (2014). Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *The Journal of cell biology* 204, 247-263.
- Ji, R. P., Phoon, C. K., Aristizabal, O., McGrath, K. E., Palis, J., and Turnbull, D. H. (2003). Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circulation research* 92, 133-135.
- Jiang, H., Qi, L., Wang, F., Sun, Z., Huang, Z., and Xi, Q. (2015). Decreased semaphorin 3A expression is associated with a poor prognosis in patients with epithelial ovarian carcinoma. *International journal of molecular medicine* 35, 1374-1380.
- Johanson, C. E., Duncan, J. A., 3rd, Klinge, P. M., Brinker, T., Stopa, E. G., and Silverberg, G. D. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal fluid research* 5, 10.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry* 262, 9412-9420.
- Jones, E. A., le Noble, F., and Eichmann, A. (2006). What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology* 21, 388-395.
- Jones, E. G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *Journal of anatomy* 106, 507-520.
- Kaluzova, M., Bouras, A., Machaidze, R., and Hadjipanayis, C. G. (2015). Targeted therapy of glioblastoma stem-like cells and tumor non-stem cells using cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles. *Oncotarget* 6, 8788-8806.
- Kang, L. I., Wang, Y., Suckow, A. T., Czymmek, K. J., Cooke, V. G., Naik, U. P., and Duncan, M. K. (2007). Deletion of JAM-A causes morphological defects in the corneal epithelium. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 576-585.
- Kanmogne, G. D., Schall, K., Leibhart, J., Knipe, B., Gendelman, H. E., and Persidsky, Y. (2007). HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 123-134.
- Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M., and Togashi, S. (1998). Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *The Journal of biological chemistry* 273, 29672-29677.
- Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., *et al.* (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* 19, 2465-2475.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902.

- Ke, K., Song, Y., Shen, J., Niu, M., Zhang, H., Yuan, D., Ni, H., Zhang, Y., Liu, X., Dai, A., and Cao, M. (2015). Up-regulation of glis2 involves in neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage in adult rats. *Cellular and molecular neurobiology* 35, 345-354.
- Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., and Ferrara, N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 271, 5638-5646.
- Kikuchi, R., Nakamura, K., MacLauchlan, S., Ngo, D. T., Shimizu, I., Fuster, J. J., Katanasaka, Y., Yoshida, S., Qiu, Y., Yamaguchi, T. P., *et al.* (2014). An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nature medicine* 20, 1464-1471.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D. H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y. T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., *et al.* (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer cell* 23, 839-852.
- Kim, S. H., Joshi, K., Ezhilarasan, R., Myers, T. R., Siu, J., Gu, C., Nakano-Okuno, M., Taylor, D., Minata, M., Sulman, E. P., *et al.* (2015). EZH2 protects glioma stem cells from radiation-induced cell death in a MELK/FOXO1-dependent manner. *Stem cell reports* 4, 226-238.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., *et al.* (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kisanuki, Y. Y., Hammer, R. E., Miyazaki, J., Williams, S. C., Richardson, J. A., and Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230, 230-242.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121, 4309-4318.
- Koch, S., van Meeteren, L. A., Morin, E., Testini, C., Westrom, S., Bjorkelund, H., Le Jan, S., Adler, J., Berger, P., and Claesson-Welsh, L. (2014). NRP1 presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Developmental cell* 28, 633-646.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., *et al.* (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & development* 14, 1343-1352.
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringner, M., Morgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., and Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7312-7317.
- Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., and Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *The Journal of cell biology* 129, 203-217.

- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macswords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell stem cell* 6, 421-432.
- Lathia, J. D., Li, M., Sinyuk, M., Alvarado, A. G., Flavahan, W. A., Stoltz, K., Rosager, A. M., Hale, J., Hitomi, M., Gallagher, J., *et al.* (2014). High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor. *Cell reports* 6, 117-129.
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., *et al.* (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204, 3067-3076.
- Laura, R. P., Ross, S., Koeppen, H., and Lasky, L. A. (2002). MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Experimental cell research* 275, 155-170.
- Le Guelle, A., Galan-Moya, E. M., Dwyer, J., Treps, L., Kettler, G., Hebda, J. K., Dubois, S., Auffray, C., Chneiweiss, H., Bidere, N., and Gavard, J. (2012). Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *Journal of cell science*.
- Le, Q. T., and Courter, D. (2008). Clinical biomarkers for hypoxia targeting. *Cancer metastasis reviews* 27, 351-362.
- Lee, T. J., Haque, F., Shu, D., Yoo, J. Y., Li, H., Yokel, R. A., Horbinski, C., Kim, T. H., Kim, S. H., Kwon, C. H., *et al.* (2015). RNA nanoparticle as a vector for targeted siRNA delivery into glioblastoma mouse model. *Oncotarget*.
- Leoni, V., Solomon, A., Lovgren-Sandblom, A., Minthon, L., Blennow, K., Hansson, O., Wahlund, L. O., Kivipelto, M., and Bjorkhem, I. (2013). Diagnostic power of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid: candidate marker of brain health. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36, 739-747.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J., and Cerione, R. A. (2012). RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* 31, 4740-4749.
- Li, C. C., Eaton, S. A., Young, P. E., Lee, M., Shuttleworth, R., Humphreys, D. T., Grau, G. E., Combes, V., Bebawy, M., Gong, J., *et al.* (2013). Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA biology* 10, 1333-1344.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., *et al.* (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* 15, 501-513.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., *et al.* (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* 183, 409-417.
- Liu, X. M., Zhang, Q. P., Mu, Y. G., Zhang, X. H., Sai, K., Pang, J. C., Ng, H. K., and Chen, Z. P. (2011). Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *Journal of neuro-oncology* 105, 173-179.

- Lossinsky, A. S., and Shivers, R. R. (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histology and histopathology* 19, 535-564.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., *et al.* (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*.
- Lucio-Eterovic, A. K., Piao, Y., and de Groot, J. F. (2009). Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 4589-4599.
- Lugassy, C., Kleinman, H. K., Vernon, S. E., Welch, D. R., and Barnhill, R. L. (2007). C16 laminin peptide increases angiotropic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay. *The British journal of dermatology* 157, 780-782.
- Lugassy, C., Zadran, S., Bentolila, L. A., Wadehra, M., Prakash, R., Carmichael, S. T., Kleinman, H. K., Peault, B., Larue, L., and Barnhill, R. L. (2014). Angiotropism, pericytic mimicry and extravascular migratory metastasis in melanoma: an alternative to intravascular cancer dissemination. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 7, 139-152.
- Luo, Y., and Radice, G. L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology* 169, 29-34.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J. A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.
- Maione, F., Capano, S., Regano, D., Zentilin, L., Giacca, M., Casanovas, O., Bussolino, F., Serini, G., and Giraudo, E. (2012). Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *The Journal of clinical investigation* 122, 1832-1848.
- Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., and Giraudo, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *The Journal of clinical investigation* 119, 3356-3372.
- Man, J., Shoemake, J., Zhou, W., Fang, X., Wu, Q., Rizzo, A., Prayson, R., Bao, S., Rich, J. N., and Yu, J. S. (2014). Sema3C promotes the survival and tumorigenicity of glioma stem cells through Rac1 activation. *Cell reports* 9, 1812-1826.
- Mandel, I., Paperna, T., Volkowich, A., Merhav, M., Glass-Marmor, L., and Miller, A. (2012). The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. *Journal of cellular biochemistry* 113, 2415-2423.
- Mandell, K. J., Babbitt, B. A., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2005). Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. *The Journal of biological chemistry* 280, 11665-11674.
- Mariano, E. D., Teixeira, M. J., Marie, S. K., and Lepski, G. (2015). Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World journal of stem cells* 7, 477-482.

- Marin, E. P., Derakhshan, B., Lam, T. T., Davalos, A., and Sessa, W. C. (2012). Endothelial cell palmitoylproteomic identifies novel lipid-modified targets and potential substrates for protein acyl transferases. *Circulation research* 110, 1336-1344.
- Martin, D., Galisteo, R., and Gutkind, J. S. (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of biological chemistry* 284, 6038-6042.
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., and Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *Journal of cell science* 124, 548-555.
- Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C., Hartenstein, J. S., and Benz, E. J., Jr. (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 275, 30573-30585.
- Mazumdar, J., Dondeti, V., and Simon, M. C. (2009). Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 4319-4328.
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D., and Schneeberger, E. E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of cell science* 109 (Pt 9), 2287-2298.
- McKenna, C. C., Ojeda, A. F., Spurlin, J., 3rd, Kwiatkowski, S., and Lwigale, P. Y. (2014). Sema3A maintains corneal avascularity during development by inhibiting Vegf induced angioblast migration. *Dev Biol* 391, 241-250.
- Mehta, D., and Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* 86, 279-367.
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C. A., *et al.* (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer cell* 26, 707-721.
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., and Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS letters* 585, 606-612.
- Minshall, R. D., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Niles, W. D., Gilchrist, A., Hamm, H. E., and Malik, A. B. (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *The Journal of cell biology* 150, 1057-1070.
- Mishra, R., Thorat, D., Soundararajan, G., Pradhan, S. J., Chakraborty, G., Lohite, K., Karnik, S., and Kundu, G. C. (2015). Semaphorin 3A upregulates FOXO 3a-dependent MelCAM expression leading to attenuation of breast tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 34, 1584-1595.
- Mochida, G. H., Ganesh, V. S., Felie, J. M., Gleason, D., Hill, R. S., Clapham, K. R., Rakiec, D., Tan, W. H., Akawi, N., Al-Saffar, M., *et al.* (2010). A homozygous mutation in the tight-junction protein JAM3 causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts. *American journal of human genetics* 87, 882-889.
- Moens, S., Goveia, J., Stapor, P. C., Cantelmo, A. R., and Carmeliet, P. (2014). The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine & growth factor reviews* 25, 473-482.

- Mu, W., Rana, S., and Zoller, M. (2013). Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness. *Neoplasia* 15, 875-887.
- Muir, E. R., Shen, Q., and Duong, T. Q. (2008). Cerebral blood flow MRI in mice using the cardiac-spin-labeling technique. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 60, 744-748.
- Mulligan, S. J., and MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431, 195-199.
- Mumblat, Y., Kessler, O., Ilan, N., and Neufeld, G. (2015). Full Length Semaphorin-3c Is an Inhibitor of Tumor Lymphangiogenesis and Metastasis. *Cancer research*.
- Murakami, T., Felinski, E. A., and Antonetti, D. A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *The Journal of biological chemistry* 284, 21036-21046.
- Myster, F., Palmeira, L., Sorel, O., Bouillenne, F., DePauw, E., Schwartz-Cornil, I., Vanderplasschen, A., and Dewals, B. G. (2015). Viral semaphorin inhibits dendritic cell phagocytosis and migration but is not essential for gammaherpesvirus-induced lymphoproliferation in malignant catarrhal Fever. *Journal of virology* 89, 3630-3647.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British journal of cancer* 100, 865-869.
- Nakai, K., Tanaka, T., Murai, T., Ohguro, N., Tano, Y., and Miyasaka, M. (2005). Invasive human pancreatic carcinoma cells adhere to endothelial tri-cellular corners and increase endothelial permeability. *Cancer science* 96, 766-773.
- Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G., and Strittmatter, S. M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21, 1093-1100.
- Nakano, I. (2015). Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *Journal of neurosurgery* 122, 324-330.
- Nakano, I., Garnier, D., Minata, M., and Rak, J. (2015). Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells - Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development. *Seminars in cell & developmental biology*.
- Nakatsu, D., Kano, F., Taguchi, Y., Sugawara, T., Nishizono, T., Nishikawa, K., Oda, Y., Furuse, M., and Murata, M. (2014). JNK1/2-dependent phosphorylation of angulin-1/LSR is required for the exclusive localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts in Eph4 epithelial sheet. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 19, 565-581.
- Nandhu, M. S., Hu, B., Cole, S. E., Erdreich-Epstein, A., Rodriguez-Gil, D. J., and Viapiano, M. S. (2014). Novel paracrine modulation of Notch-DLL4 signaling by fibulin-3 promotes angiogenesis in high-grade gliomas. *Cancer research* 74, 5435-5448.
- Nanegrungsunk, D., Onchan, W., Chattipakorn, N., and Chattipakorn, S. C. (2015). Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurological research* 37, 167-183.
- Nanes, B. A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A. M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P. A., and Kowalczyk, A. P. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *The Journal of cell biology* 199, 365-380.

- Narazaki, M., and Tosato, G. (2006). Ligand-induced internalization selects use of common receptor neuropilin-1 by VEGF165 and semaphorin3A. *Blood* 107, 3892-3901.
- Nasarre, C., Koncina, E., Labourdette, G., Cremel, G., Roussel, G., Aunis, D., and Bagnard, D. (2009). Neuropilin-2 acts as a modulator of Sema3A-dependent glioma cell migration. *Cell adhesion & migration* 3, 383-389.
- Nasdala, I., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Kuhn, A., Ebnet, K., Brachtendorf, G., Samulowitz, U., Kuster, B., Engelhardt, B., Vestweber, D., and Butz, S. (2002). A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *The Journal of biological chemistry* 277, 16294-16303.
- Nehil, M., Paquette, J., Tokuyasu, T., and McCormick, F. (2014). High mobility group box 1 promotes tumor cell migration through epigenetic silencing of semaphorin 3A. *Oncogene* 33, 5151-5162.
- Newman, P. J. (1994). The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 714, 165-174.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660.
- O'Donnell, J. J., 3rd, Zhuge, Y., Holian, O., Cheng, F., Thomas, L. L., Forsyth, C. B., and Lum, H. (2011). Loss of p120 catenin upregulates transcription of pro-inflammatory adhesion molecules in human endothelial cells. *Microvascular research* 82, 105-112.
- O'Driscoll, M. C., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Black, G. C., Pilz, D. T., Brockmann, K., McEntagart, M., Abdel-Salam, G., Zaki, M., Wolf, N. I., *et al.* (2010). Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *American journal of human genetics* 87, 354-364.
- Oas, R. G., Xiao, K., Summers, S., Wittich, K. B., Chiasson, C. M., Martin, W. D., Grossniklaus, H. E., Vincent, P. A., Reynolds, A. B., and Kowalczyk, A. P. (2010). p120-Catenin is required for mouse vascular development. *Circulation research* 106, 941-951.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine* 19, 1584-1596.
- Oldendorf, W. H., and Kitano, M. (1967). Radioisotope measurement of brain blood turnover time as a clinical index of brain circulation. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 8, 570-587.
- Ong, K. L., Leung, R. Y., Babinska, A., Salifu, M. O., Ehrlich, Y. H., Kornecki, E., Wong, L. Y., Tso, A. W., Cherny, S. S., Sham, P. C., *et al.* (2009). Elevated plasma level of soluble F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) in hypertension. *American journal of hypertension* 22, 500-505.
- Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A., Corada, M., Galaup, A., Sigismund, S., Ristagno, G., Maddaluno, L., Young Koh, G., Franco, D., *et al.* (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature communications* 3, 1208.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M. M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179, 297-302.

- Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., *et al.* (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer cell* *11*, 53-67.
- Pardanaud, L., and Dieterlen-Lievre, F. (1993). Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anatomy and embryology* *187*, 107-114.
- Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* *2*, 3-14.
- Parker, M. W., Linkugel, A. D., Goel, H. L., Wu, T., Mercurio, A. M., and Vander Kooi, C. W. (2015). Structural basis for VEGF-C binding to neuropilin-2 and sequestration by a soluble splice form. *Structure* *23*, 677-687.
- Patel, S. D., Ciatto, C., Chen, C. P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T. M., Honig, B., Price, S. R., and Shapiro, L. (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* *124*, 1255-1268.
- Patel-Hett, S., and D'Amore, P. A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International journal of developmental biology* *55*, 353-363.
- Patnaik, A., LoRusso, P. M., Messersmith, W. A., Papadopoulos, K. P., Gore, L., Beeram, M., Ramakrishnan, V., Kim, A. H., Beyer, J. C., Mason Shih, L., *et al.* (2014). A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *73*, 951-960.
- Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., *et al.* (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC cancer* *10*, 66.
- Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *27*, 93-127.
- Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., and Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of cell biology* *118*, 681-691.
- Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* *436*, 128-133.
- Pfaff, D., Fiedler, U., and Augustin, H. G. (2006). Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *Journal of leukocyte biology* *80*, 719-726.
- Phng, L. K., Stanchi, F., and Gerhardt, H. (2013). Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development* *140*, 4031-4040.
- Piao, Y., Liang, J., Holmes, L., Henry, V., Sulman, E., and de Groot, J. F. (2013). Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 4392-4403.
- Pietras, A., Katz, A. M., Ekstrom, E. J., Wee, B., Halliday, J. J., Pitter, K. L., Werbeck, J. L., Amankulor, N. M., Huse, J. T., and Holland, E. C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell stem cell* *14*, 357-369.

- Pojo, M., Goncalves, C. S., Xavier-Magalhaes, A., Oliveira, A. I., Goncalves, T., Correia, S., Rodrigues, A. J., Costa, S., Pinto, L., Pinto, A. A., *et al.* (2015). A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. *Oncotarget* 6, 7657-7674.
- Potter, M. D., Barbero, S., and Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Prevents Binding of p120- and β -Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State. *J Biol Chem* 280, 31906-31912.
- Prasad, S., Gaedicke, S., Machein, M., Mittler, G., Braun, F., Hettich, M., Firat, E., Klingner, K., Schueler, J., Wider, D., *et al.* (2015). Effective eradication of glioblastoma stem cells by local application of an AC133/CD133-specific T cell-engaging antibody and CD8 T cells. *Cancer research*.
- Predescu, D., Vogel, S. M., and Malik, A. B. (2004). Functional and morphological studies of protein transcytosis in continuous endothelia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 287, L895-901.
- Qutub, A. A., and Hunt, C. A. (2005). Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain research Brain research reviews* 49, 595-617.
- Rao, R. K., Basuroy, S., Rao, V. U., Karnaky Jr, K. J., and Gupta, A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *The Biochemical journal* 368, 471-481.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine* 183, 1161-1172.
- Redzic, J. S., Ung, T. H., and Graner, M. W. (2014). Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 7, 65-77.
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824-828.
- Risau, W., and Lemmon, V. (1988). Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 125, 441-450.
- Sabag, A. D., Smolkin, T., Mumblat, Y., Ueffing, M., Kessler, O., Gloeckner, C. J., and Neufeld, G. (2014). The role of the plexin-A2 receptor in Sema3A and Sema3B signal transduction. *Journal of cell science* 127, 5240-5252.
- Saier, M. H., Jr., Tran, C. V., and Barabote, R. D. (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic acids research* 34, D181-186.
- Sainson, R. C., Aoto, J., Nakatsu, M. N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., and Hughes, C. C. (2005). Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1027-1029.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular biology of the cell* 11, 4131-4142.

Sakurai, A., Doci, C. L., and Gutkind, J. S. (2012). Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell research* 22, 23-32.

Sakurai, A., Fukuhara, S., Yamagishi, A., Sako, K., Kamioka, Y., Masuda, M., Nakaoka, Y., and Mochizuki, N. (2006). MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of vascular endothelial cadherin-mediated cell adhesion. *Molecular biology of the cell* 17, 966-976.

Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1076-1081.

Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A. C., Alvarez, V. E., Lee, N. C., and Hall, G. F. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 287, 3842-3849.

Sardjono, C. T., Harbour, S. N., Yip, J. C., Paddock, C., Tridandapani, S., Newman, P. J., and Jackson, D. E. (2006). Palmitoylation at Cys595 is essential for PECAM-1 localisation into membrane microdomains and for efficient PECAM-1-mediated cytoprotection. *Thrombosis and haemostasis* 96, 756-766.

Satchell, S. (2013). The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nature reviews Nephrology* 9, 717-725.

Sauer, H., Ravindran, F., Beldoch, M., Sharifpanah, F., Jedelska, J., Strehlow, B., and Wartenberg, M. (2013). alpha2-Macroglobulin enhances vasculogenesis/angiogenesis of mouse embryonic stem cells by stimulation of nitric oxide generation and induction of fibroblast growth factor-2 expression. *Stem cells and development* 22, 1443-1454.

Schrade, A., Sade, H., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B. B., and Niewoehner, J. (2012). Expression and localization of claudins-3 and -12 in transformed human brain endothelium. *Fluids and barriers of the CNS* 9, 6.

Severson, E. A., and Parkos, C. A. (2009). Structural determinants of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling. *Current opinion in cell biology* 21, 701-707.

Shaifer, C. A., Huang, J., and Lin, P. C. (2010). Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 2063-2075.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.

Shao, H., Chung, J., Balaj, L., Charest, A., Bigner, D. D., Carter, B. S., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Weissleder, R., and Lee, H. (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature medicine* 18, 1835-1840.

- Shao, H., Chung, J., Lee, K., Balaj, L., Min, C., Carter, B. S., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Lee, H., and Weissleder, R. (2015). Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature communications* 6, 6999.
- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327-337.
- Sharma, S., Das, K., Woo, J., and Gimzewski, J. K. (2014). Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11, 20131150.
- Shen, B., Wu, N., Yang, J. M., and Gould, S. J. (2011). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *The Journal of biological chemistry* 286, 14383-14395.
- Sherwood, L. (2012). *Fundamentals of human physiology*, 4th ed).
- Shibuya, M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function* 26, 25-35.
- Sidibe, A., Mannic, T., Arboleas, M., Subileau, M., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., Jan, M., Vandhuick, T., Le Loet, X., Vittecoq, O., and Vilgrain, I. (2012). Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor alpha-induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis and rheumatism* 64, 77-87.
- Signore, M., Pelacchi, F., di Martino, S., Runci, D., Biffoni, M., Giannetti, S., Morgante, L., De Majo, M., Petricoin, E. F., Stancato, L., *et al.* (2014). Combined PDK1 and CHK1 inhibition is required to kill glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Cell death & disease* 5, e1223.
- Simpson, I. A., Carruthers, A., and Vannucci, S. J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 1766-1791.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer research* 63, 5821-5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., and Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 10, 1470-1476.
- Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R. M., Kesari, S., and Verma, I. M. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4274-4280.
- Soda, Y., Myskiw, C., Rommel, A., and Verma, I. M. (2013). Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *Journal of molecular medicine* 91, 439-448.

Sohet, F., Lin, C., Munji, R. N., Lee, S. Y., Ruderisch, N., Soung, A., Arnold, T. D., Derugin, N., Vexler, Z. S., Yen, F. T., and Daneman, R. (2015). LSR/angulin-1 is a tricellular tight junction protein involved in blood-brain barrier formation. *The Journal of cell biology* 208, 703-711.

Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J., and Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell stem cell* 4, 440-452.

Song, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, H., Fu, Z., Ye, J., Liu, L., Song, X., and Wu, Y. (2012). Expression of semaphorin 3A and neuropilin 1 with clinicopathological features and survival in human tongue cancer. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 17, e962-968.

Sorensen, S. C. (1974). The permeability to small ions of tight junctions between cerebral endothelial cells. *Brain research* 70, 174-178.

Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R. R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M. S. (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Molecular and cellular biology* 26, 2387-2398.

Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S., and Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC cell biology* 10, 95.

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology* 103, 755-766.

Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., and et al. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 270, 27348-27357.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352, 987-996.

Suva, M. L., Riggi, N., Janiszewska, M., Radovanovic, I., Provero, P., Stehle, J. C., Baumer, K., Le Bitoux, M. A., Marino, D., Cironi, L., et al. (2009). EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer research* 69, 9211-9218.

Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., et al. (2015). Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature genetics* 47, 458-468.

Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., and Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* 10, 923-934.

Takahashi, T., and Strittmatter, S. M. (2001). PlexinA1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron* 29, 429-439.

Takenaga, Y., Takagi, N., Murotomi, K., Tanonaka, K., and Takeo, S. (2009). Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1099-1108.

- Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H., and Kolodkin, A. L. (2002). MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* *109*, 887-900.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of immunology* *166*, 7309-7318.
- Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology* *9*, 581-593.
- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B. C., Delisle, C., and Gratton, J. P. (2010). S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular cell* *39*, 468-476.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., Jr., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et biophysica acta* *645*, 63-70.
- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y. C., Stelzhammer, W., Krizbai, I. A., Fresser, F., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2002). The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *The Journal of biological chemistry* *277*, 10201-10208.
- Tuccillo, F. M., de Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A., Tassone, P., Scala, I., Buonaguro, F. M., Quinto, I., and Scala, G. (2014). Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *BioMed research international* *2014*, 742831.
- Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Papageorgiou, A. P., Lampugnani, M. G., Gamp, A. C., Vestweber, D., Adamson, P., Dejana, E., and Greenwood, J. (2008). Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *Journal of cell science* *121*, 29-37.
- Turpin, A., Sharif, A., Stoven, L., Blond, S., Maurage, C. A., and Le Rhun, E. (2015). [The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]. *Bulletin du cancer* *102*, 24-33.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* *437*, 426-431.
- Vacca, A., Scavelli, C., Serini, G., Di Pietro, G., Cirulli, T., Merchionne, F., Ribatti, D., Bussolino, F., Guidolin, D., Piaggio, G., *et al.* (2006). Loss of inhibitory semaphorin 3A (SEMA3A) autocrine loops in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Blood* *108*, 1661-1667.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., and Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* *9*, 654-659.
- van der Mijn, J. C., Sol, N., Mellema, W., Jimenez, C. R., Piersma, S. R., Dekker, H., Schutte, L. M., Smit, E. F., Broxterman, H. J., Skog, J., *et al.* (2014). Analysis of AKT and ERK1/2 protein kinases in extracellular vesicles isolated from blood of patients with cancer. *Journal of extracellular vesicles* *3*, 25657.
- Varshavsky, A., Kessler, O., Abramovitch, S., Kigel, B., Zaffryar, S., Akiri, G., and Neufeld, G. (2008). Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like pro-protein convertases. *Cancer research* *68*, 6922-6931.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant

subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* 17, 98-110.

Veron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood cells, molecules & diseases* 35, 81-88.

Vilgrain, I., Sidibe, A., Polena, H., Cand, F., Mannic, T., Arboleas, M., Boccard, S., Baudet, A., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., *et al.* (2013). Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PloS one* 8, e80056.

Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., and Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26, 1067-1077.

Walsh, T. G., Murphy, R. P., Fitzpatrick, P., Rochfort, K. D., Guinan, A. F., Murphy, A., and Cummins, P. M. (2011). Stabilization of brain microvascular endothelial barrier function by shear stress involves VE-cadherin signaling leading to modulation of pTyr-occludin levels. *Journal of cellular physiology* 226, 3053-3063.

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829-833.

Wang, T., Gilkes, D. M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C. J., Chaturvedi, P., Green, J. J., and Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E3234-3242.

Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G. J., Zhang, P., McKeever, P. E., Lee, E. Y., and Zhu, Y. (2009). Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer cell* 15, 514-526.

Weekes, C. D., Beeram, M., Tolcher, A. W., Papadopoulos, K. P., Gore, L., Hegde, P., Xin, Y., Yu, R., Shih, L. M., Xiang, H., *et al.* (2014). A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* 32, 653-660.

Wegmann, F., Ebnet, K., Du Pasquier, L., Vestweber, D., and Butz, S. (2004). Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Experimental cell research* 300, 121-133.

Weis, S., Cui, J., Barnes, L., and Cheresh, D. (2004a). Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *The Journal of cell biology* 167, 223-229.

Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N., *et al.* (2004b). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 113, 885-894.

Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., *et al.* (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 19, 1872-1874.

Wenfu, T. (2010). General overview on developmental and pathological angiogenesis, Vol Adhesion and guidance receptors in angiogenesis).

- Westphal, M., and Lamszus, K. (2011). The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nature reviews Neuroscience* 12, 495-508.
- Wittchen, E. S., Haskins, J., and Stevenson, B. R. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *The Journal of biological chemistry* 274, 35179-35185.
- Witwer, K. W., Buzas, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lasser, C., Lotvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., *et al.* (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles* 2.
- Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C., and Gage, F. H. (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 430, 350-356.
- Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of cell biology* 163, 535-545.
- Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C., Ali, S. M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and cellular biology* 28, 1669-1678.
- Xu, L., Guo, R., Xie, Y., Ma, M., Ye, R., and Liu, X. (2015). Caveolae: molecular insights and therapeutic targets for stroke. *Expert opinion on therapeutic targets*, 1-18.
- Yaffe, Y., Shepshelovitch, J., Nevo-Yassaf, I., Yeheskel, A., Shmerling, H., Kwiatek, J. M., Gaus, K., Pasmanik-Chor, M., and Hirschberg, K. (2012). The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *Journal of cell science* 125, 3545-3556.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123, 889-901.
- Yamamoto, M., Ramirez, S. H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R. L., Kaibuchi, K., Persidsky, Y., and Ikezu, T. (2008). Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *The American journal of pathology* 172, 521-533.
- Yan, K., Wu, Q., Yan, D. H., Lee, C. H., Rahim, N., Tritschler, I., DeVecchio, J., Kalady, M. F., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2014a). Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy. *Genes & development* 28, 1085-1100.
- Yan, K., Yang, K., and Rich, J. N. (2013). The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Current opinion in neurology* 26, 701-707.
- Yan, T., Mizutani, A., Chen, L., Takaki, M., Hiramoto, Y., Matsuda, S., Shigehiro, T., Kasai, T., Kudoh, T., Murakami, H., *et al.* (2014b). Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles. *Journal of Cancer* 5, 572-584.
- Yang, S., Chen, Y., Deng, X., Jiang, W., Li, B., Fu, Z., Du, M., and Ding, R. (2013). Hemoglobin-induced nitric oxide synthase overexpression and nitric oxide production contribute to blood-brain barrier disruption in the rat. *Journal of molecular neuroscience : MN* 51, 352-363.

- Yaron, A., Huang, P. H., Cheng, H. J., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron* 45, 513-523.
- You, W. K., Yotsumoto, F., Sakimura, K., Adams, R. H., and Stallcup, W. B. (2014). NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17, 61-76.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K., and Eichmann, A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129, 4797-4806.
- Yuan, S. Y., and Rigor, R. R. (2010). Regulation of Endothelial Barrier Function. In, (San Rafael (CA)).
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L., and Yu, J. S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C. C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 123-129.
- Zhang, G. S., Tian, Y., Huang, J. Y., Tao, R. R., Liao, M. H., Lu, Y. M., Ye, W. F., Wang, R., Fukunaga, K., Lou, Y. J., and Han, F. (2013). The gamma-secretase blocker DAPT reduces the permeability of the blood-brain barrier by decreasing the ubiquitination and degradation of occludin during permanent brain ischemia. *CNS neuroscience & therapeutics* 19, 53-60.
- Zhang, J., O'Donnell, J. J., 3rd, Holian, O., Vincent, P. A., Kim, K. S., and Lum, H. (2010). P120 catenin represses transcriptional activity through Kaiso in endothelial cells. *Microvascular research* 80, 233-239.
- Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F., and Xu, B. (2015). The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell death & disease* 6, e1600.
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A. J., Perry, S. R., Tonon, G., Chu, G. C., Ding, Z., *et al.* (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455, 1129-1133.
- Zhou, H., Wu, A., Fu, W., Lv, Z., and Zhang, Z. (2014). Significance of semaphorin-3A and MMP-14 protein expression in non-small cell lung cancer. *Oncology letters* 7, 1395-1400.
- Zhu, T. S., Costello, M. A., Talsma, C. E., Flack, C. G., Crowley, J. G., Hamm, L. L., He, X., Hervey-Jumper, S. L., Heth, J. A., Muraszko, K. M., *et al.* (2011). Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer research* 71, 6061-6072.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine* 4, 594-600.
- Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178-201.

Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews Neuroscience* 12, 723-738.

Zovein, A. C., Luque, A., Turlo, K. A., Hofmann, J. J., Yee, K. M., Becker, M. S., Fassler, R., Mellman, I., Lane, T. F., and Iruela-Arispe, M. L. (2010). Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Developmental cell* 18, 39-51.

Les capillaires cérébraux sont caractérisés par une structure et une organisation particulière au sein de l'unité neurovasculaire. Au travers de jonctions endothéliales particulièrement sélectives, la barrière hémato-encéphalique (BHE) orchestre les échanges de cellules, fluides, protéines et métabolites plasmatiques entre le sang et le compartiment cérébral. La VE-cadhérine, protéine transmembranaire des jonctions endothéliales, est particulièrement importante dans l'intégrité vasculaire puisque sa déstabilisation entraîne un affaiblissement de la BHE et conduit à sa rupture dans certaines pathologies.

Le glioblastome est une tumeur cérébrale extrêmement agressive et associée à un haut degré de vascularisation dont la perméabilité est anormalement élevée. Ceci contribue à la formation d'œdèmes vasculaires péri-tumoraux préjudiciables pour la santé du patient. Depuis la dernière décennie, un grand nombre d'études ont relié la présence d'une sous-population de cellules souches gliomateuses (CSG) à l'initiation, la récurrence et l'agressivité du glioblastome. De façon importante, ces CSG sont localisées dans un microenvironnement particulier, appelé niche vasculaire, dans lequel elles communiquent étroitement et échangent de manière bidirectionnelle avec l'endothélium cérébral. Sur la base d'un modèle de coculture entre CSG issues de patients, et cellules endothéliales cérébrales récapitulant les propriétés de la BHE, notre laboratoire a porté son attention sur la Sémaphorine 3A (Séma3A). Cette protéine est en effet sécrétée par les CSG et exerce, via son corécepteur Neuropiline-1 (Nrp-1), une action positive sur la perméabilité vasculaire par déstabilisation de la VE-cadhérine.

Durant mes travaux de thèse, nous avons identifié et caractérisé la présence de la Séma3A à la membrane de vésicules extracellulaires (EV) produites par les CSG. Un nombre grandissant d'études met en exergue l'implication de ces vésicules dans la biologie tumorale. Dans ce sens, nous avons démontré que les EV des CSG peuvent pénétrer dans les cellules endothéliales, et moduler leurs propriétés intrinsèques. Au travers de modèles *in vivo* originaux et de la combinaison de stratégies génétiques (ARN interférent) et pharmacologiques (anticorps bloquant humanisés), nous avons d'une part montré que la Séma3A, portée par les EV, agit spécifiquement via la Nrp-1 exprimée par les cellules endothéliales afin d'augmenter leur perméabilité. D'autre part, dans un modèle de xénogreffe orthotopique de CSG, nous avons identifié une augmentation significative du taux de Séma3A dans la fraction de EV circulantes. De manière intéressante, des résultats similaires ont été obtenus à partir de prélèvements de patients GBM nouvellement diagnostiqués. La Séma3A de ces vésicules, apte à augmenter la perméabilité vasculaire à distance, *in vitro* et *in vivo* au travers de la Nrp-1, représenterait donc un bon candidat en tant que futur marqueur théranostique du glioblastome.